

MARCELO DE CARVALHO

**ATIVIDADES DA PEÇONHA DA
Bothrops lanceolatus E SUA NEUTRALIZAÇÃO
COM IMUNESOROS ESPECÍFICOS**

CAMPINAS

Unicamp

2008

MARCELO DE CARVALHO

**ATIVIDADES DA PEÇONHA DA
Bothrops lanceolatus E SUA NEUTRALIZAÇÃO
COM IMUNESOROS ESPECÍFICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia

Orientadora: Profa Dra. Albetiza Lobo de Araújo

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C253a Carvalho, Marcelo de
 Atividades da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e sua neutralização
 com imunesoros específicos / Marcelo de Carvalho. Campinas, SP:
 [s.n.], 2008.

Orientador: Albetiza Lobo de Araújo
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Bothrops lanceolatus*. 2. Veneno. 3. Serpentes. 4. Anticorpos.
I. Araújo, Albetiza Lobo de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Poison activities of the *Bothrops lanceolatus* and your
neutralization with specific immuneserums**

Keywords: • *Bothrops lanceolatus*
 • Venom
 • Snake
 • Antibodies

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Albetiza Lobo de Araújo

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Prof. Dr. José Carlos Cogo

Data da defesa: 28-11-2008

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Marcelo de Carvalho

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Albetiza Lôbo de Araújo

Albetiza Lôbo de Araújo

Membros:

Professor (a) Doutor (a) **José Carlos Cogo**

José Carlos Cogo

Professor (a) Doutor (a) **Stephen Hyslop**

Stephen Hyslop

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/11/2008

Dedicatória

« Totus tuus! Oh Maria. »

A Deus,
que me deu a benção e
me permitiu realizar mais este sonho em minha vida.

A meus pais,
que sempre rezaram por mim e
me ensinaram desde o princípio a essência da vida.

A minhas irmãs,
que sempre estiveram ao meu lado,
instigando-me a continuar e a não desistir dos meus sonhos.

Em especial a
minha irmã Sandra,
que se empenhou em minha formação e
de minhas irmãs sem medir esforços.

A minha tia Aparecida (memória),
que me ensinou muito sobre a vida e
sobre ser paciente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, que me incentivou em todos os momentos, desde o princípio acreditou em meu potencial e lapidou-me como uma pedra de grande valor, abrindo para mim o horizonte da ciência, sempre com grande empenho, tal como um pai instrui e incentiva um filho.

À Prof^a. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo, pela orientação, por acreditar em meu trabalho, pela abertura e incentivo no desenvolvimento do mesmo, contribuindo de todas as formas para que tivesse acesso ao conhecimento, sendo um apoio seguro em todos os momentos principalmente naqueles em que mais precisei.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela prontidão, disposição e amizade durante todo este período em que permaneci no Departamento de Farmacologia, sendo de suma importância para mim.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela ajuda nos testes farmacológicos *in vitro*, realizados em seu laboratório sob sua análise crítica, bem como pelo conhecimento compartilhado, ao qual sou grato.

À Prof^a. Dra. Leonilda M. Barbosa dos Santos, pela contribuição científica, conhecimento e discussão que contribuíram grandemente em minha formação.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Augusto Sant'Anna, pela prontidão e disposição, em discutir os resultados deste trabalho, o que foi valoroso para o andamento deste projeto de pesquisa.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp, pelas aulas ministradas em disciplinas que contribuíram muito para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas.

Ao CEMIB representado pelos professores: Dra. Ana Maria A. Guaraldo e Dr. Rovilson Gilioli, pela atenção e amizade, sempre prontos e prestativos e também pelas disciplinas que cursei.

Ao Laboratório 5, representado por José Raimundo (José Rai), Marcel, Luis e Juliete, pela amizade e profissionalismo, que partilhei durante o período que convivemos.

Ao Laboratório 4, representado pela Dra. Elaine, à atenção em discutir os resultados do ELISA, bem como o incentivo. À Patrícia, Rose e Juliana, pela amizade e atenção que recebi durante a realização dos testes.

Aos funcionários do biotério do departamento de Imuno e Micro, representado por Marcos César e ao Senhor Antônio, que sem dúvida não mediram esforços em me ajudar, sendo prestativos em todos os momentos.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Imunologia, representado por Lúcia e Dirce.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Farmacologia representado por José Hilton, que pacientemente me ajudou durante o andamento dos experimentos realizados no laboratório. Ao Toninho, Gildo e tantos outros que participaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia, pelo apoio e amizade que usufrui ao decorrer deste projeto de pesquisa. Aos alunos e funcionários do laboratório de Imunofarmacologia, Renata, Cristina, Lucimara, Carol, Daniel, Paula, Fabiana, Valéria e Alessandra, pela grande amizade, profissionalismo, bem como espírito de cooperação em diversos testes e momentos de dificuldades em que passamos.

A minha grande amiga e profissional Celinha, que esteve presente desde os primeiros momentos (estágios, ao longo das disciplinas, na elaboração de protocolos e experimentos) e ao longo deste projeto de pesquisa.

Ao meu colega de laboratório Paulo Anselmo (Janjão do Bosque), pelo grande esforço e ajuda em diversos testes, também na obtenção de materiais biológicos, sem os quais não poderia ter sido realizado este trabalho.

Ao CCI representado por Sueli, pelos soros e anticorpos cedidos para a realização de testes, bem como por toda a disponibilidade e acessibilidade, que pude usufruir.

À Cássia e à Juliana, por terem cedido os anticorpos conjugados, que foram de grande importância nos testes do ELISA, realizados ao decorrer deste trabalho.

À Lourdes e Delano, que em muitos momentos compartilharam seu tempo e conhecimento para discutirmos resultados e sugerir novas formas de observação. Ao Tomas, Renata, Sandro, Rafael, André, Valdemir, Sharlene, Dina, Luís e Enilton, que com grande atenção sempre estiveram próximos e dividiram muitos momentos, em congressos, no cafezinho, nas disciplinas cursadas e outros.

Aos funcionários da secretaria de Graduação (Fran e Elaine) e Pós-Graduação (Wanderlei), pela amizade, auxílio e empenho na organização de documentos.

Aos funcionários do biotério do departamento de Farmacologia representado pelo Senhor Miguel e Marcos, pela amizade, respeito e atenção que recebi e também pela incansável dedicação aos animais com que realizávamos os experimentos.

Aos amigos do grupo de oração universitário (GOU), que em muitos momentos dedicaram de seu tempo para conversar e rezar, para o bom andamento deste projeto de pesquisa e minha felicidade.

Enfim, a tantos colegas que dedicaram um pouco de seu tempo, mesmo que com um sorriso, ou um cumprimento, participaram de meu dia.

	Pág.
RESUMO	xxxiii
ABSTRACT	xxxvii
1- INTRODUÇÃO	41
1.1- Venenos de serpentes e envenenamentos	43
1.2- Atividades das peçonhas do gênero <i>Bothrops</i>	46
1.3- Envenenamentos ocasionados pela <i>Bothrops lanceolatus</i>	51
1.4- Sistema imunológico e peçonhas ofídicas	53
1.5- Soroterapia	58
2- OBJETIVOS	63
3- MATERIAL E MÉTODOS	67
3.1- Animais	69
3.1.1- Camundongos.....	69
3.1.2- Coelhos.....	69
3.2- Peçonhas	69
3.2.1- <i>Bothrops lanceolatus</i>	69
3.2.2- <i>Bothrops jararaca</i>	70

3.3- Fracionamento da peçonha de <i>Bothrops lanceolatus</i>.....	70
3.3.1- Cromatografia de exclusão em Sephadex G-100.....	70
3.3.2- Frações da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i>	70
3.4- Reagentes.....	71
3.4.1- Imunesoro comercial anti - <i>Bothrops lanceolatus</i>	71
3.4.2- Adjuvante.....	71
3.5- Antígenos.....	71
3.5.1- Eritrócito de carneiro para imunização em camundongos.....	71
3.5.2- Fração II da <i>Bothrops lanceolatus</i> para imunização em coelhos.....	72
3.6- Imunizações.....	72
3.6.1- Camundongos.....	72
3.6.2- Coelhos.....	72
3.7- Determinação das concentrações protéicas.....	73
3.7.1- Determinação da concentração de eritrócitos de carneiro (EC).....	73
3.8- Determinação dos títulos de anticorpos.....	73
3.8.1- Título de aglutininas anti-EC.....	73
3.8.2- Título de anticorpos antiveneno.....	74

3.8.2.1- Imunodifusão.....	74
3.8.2.2- Ensaio imunoenzimático ELISA.....	74
3.8.2.3- Atividade hemorrágica.....	75
3.8.2.4- Neutralização da atividade hemorrágica.....	75
3.8.2.5- Atividade hemolítica indireta.....	76
3.8.2.6- Neutralização da atividade hemolítica indireta.....	77
3.8.2.7- Atividade proteolítica sobre a caseína 1%.....	77
3.8.2.8- Neutralização da atividade proteolítica sobre a caseína 1%.....	78
3.8.2.9- Atividade esterásica sobre TAME.....	78
3.8.2.10- Neutralização da atividade esterásica sobre TAME.....	79
3.8.2.11- Atividade coagulante sobre o fibrinogênio.....	79
3.8.2.12- Neutralização da atividade coagulante sobre o fibrinogênio.....	80
3.9- Análise Estatística.....	80
4- RESULTADOS.....	81
4.1- Efeito do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i> sobre a resposta imune primária e secundária a eritrócitos de carneiro em camundongos.....	83
4.2- Fracionamento da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i>.....	86

4.3- Efeito das frações da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> sobre a resposta primária e secundária a eritrócitos de carneiro e camundongos.....	87
4.4- Imunização de coelhos para a obtenção de imunesoros.....	90
4.5- Atividades biológicas da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> e sua neutralização com imunesoros específicos.....	93
4.5.1- Atividade hemorrágica.....	94
4.5.2- Atividade hemolítica indireta.....	97
4.5.3- Atividade caseinolítica.....	100
4.5.4- Atividade esterásica sobre TAME.....	102
4.5.5- Atividade coagulante sobre o fibrinogênio.....	104
5- DISCUSSÃO.....	107
6- CONCLUSÕES.....	117
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
8- ANEXOS.....	145
8.1- Protocolo: Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	147
9- APÊNDICE.....	149
9.1- Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental SBFTE 40 ANOS.....	151
9.2- IX Congresso Brasileiro de Toxinologia SBTx.....	153

9.3- 13th International Congresso of Immunology.....	155
9.4- III Graduation Workshop - Botucatu Medical School-UNESP.....	157
9.5- 40° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental.....	159
9.6- Publicação de Trabalho ©2007 by MEDIMOND S.r.l. 405 H821S5129.....	161

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
Abs	Absorbância
<i>B. jararaca</i>	<i>Bothrops jararaca</i>
BL	<i>Bothrops lanceolatus</i>
BSA	Albumina Bovina
C2	Componente do Sistema Complemento
C3	Componente do Sistema Complemento
C4	Componente do Sistema Complemento
C5	Componente do Sistema Complemento
C9	Componente do Sistema Complemento
CD	Cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)
CVF	Fator de Veneno de Cobra
DL₅₀	Dose Letal em 50% da população
DO	Densidade Óptica
EC	Eritrócitos de Carneiro
FI	Fração I da <i>Bothrops lanceolatus</i>
FII	Fração II da <i>Bothrops lanceolatus</i>

FIII	Fração III da <i>Bothrops lanceolatus</i>
hs	Horas
IgA	Imunoglobulina
IgD	Imunoglobulina
IgE	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina
IgM	Imunoglobulina
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanômetros
OPD	Ophenylenediamine
PBS	Tampão Salina Fosfatada
PLA₂	Fosfolipase A ₂
SFB	Soro Fetal Bovino
TAME	(p-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ésterhydrochloride)
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
VBL	Veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 <i>Bothrops lanceolatus</i> - Endêmica da Ilha da Martinica.....	62
Figura 2 Efeito da peçonha de <i>Bothrops lanceolatus</i> sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Primária.....	84
Figura 3 Efeito da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Secundária.....	85
Figura 4 Cromatografia em Sephadex G-100.....	86
Figura 5 Efeito da peçonha de <i>Bothrops lanceolatus</i> e de suas frações sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Primária.....	88
Figura 6 Efeito da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> e das suas frações sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Secundária.....	89
Figura 7 Imunodifusão Radial (precipitação com os Imunesoros).....	91
Figura 8 Curva de titulação das concentrações dos soros hiperimunes frente ao antígeno da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> em teste imunoenzimático (ELISA).....	92
Figura 9 Curva de titulação das concentrações dos soros hiperimunes frente ao antígeno da peçonha da <i>Bothrops jararaca</i> (reatividade cruzada) em teste imunoenzimático (ELISA).....	93

Figura 10	Efeito das concentrações da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> (BL) na formação do halo hemorrágico em camundongos.....	95
Figura 11	Comparação dos imunesoros específicos em neutralizar a atividade hemorrágica da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i>	96
Figura 12	Influencia de diferentes concentrações da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> (BL) sobre a hemólise de eritrócitos de carneiro (2,5%) suspensos em PBS contendo gema de ovo.....	98
Figura 13	Comparação dos imunesoros em neutralizar a atividade hemolítica da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> sobre eritrócitos de carneiro (2,5%) suspensos em PBS contendo gema de ovo.....	99
Figura 14	Atividade proteolítica da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> (BL) sobre a caseína1% e sua neutralização com imunesoros.....	101
Figura 15	Cinética da atividade TAME Esterásica da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> (BL) e dos imunesoros.....	102
Figura 16	Neutralização da Atividade TAME Esterásica da Peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> (BL).....	103
Figura 17	Cinética da atividade coagulante da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> (BL) sobre o fibrinogênio humano.....	105
Figura 18	Neutralização da atividade coagulante da peçonha da <i>Bothrops lanceolatus</i> (BL) sobre o fibrinogênio humano.....	106

RESUMO

Envenenamentos causados por picadas de serpentes peçonhentas, resultam em graves efeitos biológicos devido à complexidade das peçonhas, condições da vítima, fatores genéticos, entre outros. O tratamento mais eficaz em acidentes ofídicos se faz com uso da soroterapia, embora possa ocorrer reações de hipersensibilidade. A *Bothrops lanceolatus* endêmica da Ilha da Martinica no Caribe, possui atividades biológicas que se assemelham as das *Bothrops* brasileiras.

Camundongos previamente tratados com 4,8µg/g da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e após 72 horas imunizados com eritrócitos de carneiro (EC) apresentaram uma inibição na produção de anticorpos anti-EC, tanto na resposta primária, quanto na secundária ($P < 0,05$). Esse resultado foi observado com a fração I (2,4µg/g) ($P < 0,05$), obtida por cromatografia de exclusão em Sephadex G-100. Já a fração II (FII) (2,4µg/g) não apresentou essa inibição ($P > 0,05$). Coelhos imunizados com 1mg da FII em adjuvante de Freund, produziram um imunesoro (Anti-FII) mais reativo ao veneno da *Bothrops lanceolatus* que o imunesoro comercial (Anti-BL) produzido em eqüinos demonstrado através de testes de Imunodifusão e ELISA. Ambos imunesoros neutralizaram as atividades hemorrágica, hemolítica, caseinolítica, esterásica e coagulante da peçonha da *Bothrops lanceolatus*. O Anti-FII foi mais eficiente em neutralizar as atividades hemolítica e caseinolítica e o Anti-BL, as atividades hemorrágica e coagulante. A esterásica foi igualmente neutralizada por ambos.

Nossos resultados indicam que através da seleção do imunógeno, consegue-se produzir imunesoros mais potentes para neutralizarem os efeitos fisiopatológicos observados nos envenenamentos ofídicos.

ABSTRACT

Poisonings caused by venom snakes bitten result in serious biological effects due to several factors, such as: the complexity of ofidic poison, victim conditions, genetic factors, and others. The most efficacious treatment of these ofidic accidents is made by serum therapy that may cause hypersensitivity reactions. Endemic *Bothrops lanceolatus* (BL) from the Caribbean Island Martinica has some biological activities similar to the Brazilian *Bothrops*.

Mice previously treated with 4.8 µg/g *Bothrops lanceolatus* poison and after 72 hours immunized with sheep erythrocytes (SE) showed inhibition in the production of antibodies Anti-SE in primary and secondary response ($P < 0.05$). This effect was also noticed with the fraction I (2.4 µg/g) ($P < 0.05$) obtained by Sephadex G-100 exclusion chromatography. The fraction II (FII) (2.4 µg/g) of *Bothrops lanceolatus*, which did not present significant inhibition of immune response ($P > 0.05$), was used as antigen (in immunization). Rabbits immunized with 1 mg the fraction II in adjuvant of Freund produced immunoserum (Anti-FII) more reactive for *Bothrops lanceolatus* venom than the commercial (Anti-BL) one produced in equines demonstrated by tests of immunodiffusion and ELISA. Both immunoserums neutralized the hemorrhagic, hemolytic, caseinolytic, esterolytic and coagulation activities of the *Bothrops lanceolatus* poison. The Anti-FII was more efficient in neutralization of hemolytic and caseinolytic activities and Anti-BL hemorrhagic and coagulation activities. The esterolytic activity was equally neutralized in both immunoserums.

Our results suggest that through the selection of antigen (immunogenic) it is possible to produce more potent immunoserum to neutralize the physiopathological effects observed in the ophidian poisonings.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Venenos de serpentes e envenenamentos

Em todos os níveis da escala filogenética animal, encontramos vários exemplos de ataques, defesa e outros comportamentos que dependem de substâncias repelentes, paralisantes ou de outras ações biológicas. Durante milhões de anos de evolução, os organismos desenvolveram um refinamento dessas substâncias para diversas funções, tais como, a captura de presas e as defesas químicas em geral. Podemos classificar como peçonhentos animais que possuem glândulas especializadas associadas a ductos excretores possuindo ou não estruturas inoculadoras de toxinas (Freitas, 1991).

Entre as peçonhas mais comuns podemos destacar, as peçonhas ofídicas que são responsáveis por causarem grande parte dos acidentes, tanto em animais como em seres humanos, tornando-se um problema de saúde pública, tendo em vista que são responsáveis por mais de 40.000 mortes anuais de pessoas no mundo. Este fato chama à atenção da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), que têm incentivado estudos na área de ofidismo. Os pontos mais focados destes estudos passam por esferas como: padronização dos esquemas de tratamento com antiveneno; produção de antivenenos eficazes e potentes com especificidade comprovada; aprofundamento de técnicas que possibilitem diagnóstico precoce do agente causador do acidente; ampliar os estudos epidemiológicos propiciando conhecimento amplo e real dos acidentes (WHO, 1981).

Com relação às serpentes, são répteis com grande capacidade de adaptação, se distribuem por quase todos os ambientes do globo, com exceção das calotas polares, onde o clima impossibilita a vida de vertebrados ectotérmicos. Existem divergências entre autores quanto ao número de espécies (Wuster et al., 1997). Segundo Franco (2003) existem, no mundo, cerca de 2900 espécies de serpentes, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, segundo Melgarejo (2003) são encontradas 9 famílias; 75 gêneros e 321 espécies, o que corresponde a cerca de 10% do total de espécies existentes no mundo.

A família Viperidae, com cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo é formada por serpentes com aparelho inoculador do tipo solenóglifo, com cabeça triangular, recoberto com pequenas escamas de aspecto similar às do corpo. Possui ainda a subfamília Crotalinae, que se caracteriza pela presença da fosseta loreal. O grupo de serpentes da família Viperidae é responsável pela maioria e mais graves acidentes ofídicos registrados, não só no Brasil, como em outros países americanos. Quanto à distribuição, o gênero *Bothrops* pode ser encontrado desde a região norte do México na América do Norte até o sul da Argentina, na América do Sul, incluindo toda a América Central. O gênero *Crotalus* pode ser encontrado em todas as Américas e o gênero *Lachesis* na América do Sul e Central. Atualmente são descritos mais dois gêneros; o *Bothriopsis* composto por serpentes arborícolas, com cauda preênsil; e o *Bothrocophias* serpentes que apresentam focinho modificado, encontradas na América do Sul (Melgarejo, 2003).

A Família Elapidae, possui aparelho inoculador do tipo proteróglifo e está amplamente distribuída em todo o mundo com cerca de 250 espécies. Nas Américas, é representada pelos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus*, possuem cabeça oval, placas simétricas com ausência de fosseta loreal (Melgarejo, 2003).

Dados da Fundação Nacional de Saúde (Brasil, 1998) mostram que os acidentes ofídicos são constantes e em grande número no Brasil. Essas informações revelam a importância médica desses acidentes, devido aos efeitos fisiopatológicos que ocorrem com as pessoas vitimadas. As notificações nesses acidentes são atribuídas às serpentes dos gêneros:

* Gênero *Bothrops* (90.5%);

* Gênero *Crotalus* (7.7%);

* Gênero *Lachesis* (1.4%);

* Gênero *Micrurus* (0.4%);

(Pinho e Pereira, 2001; França e Málaque, 2003).

Os venenos são misturas complexas de proteínas com funções diversas, alguns venenos ofídicos chegam a ter cerca de 90% ou mais de seu peso seco, constituído por proteínas. Algumas espécies de serpentes como a cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) e a coral (*Micrurus corallinus*), produzem lesões ou efeitos longe do local da picada, outras como as do gênero *Bothrops* produzem lesões principalmente no local da picada (França e Málaque, 2003).

A composição química dos venenos é complexa (Sitprija, 2008). As lesões produzidas por eles dependem da natureza de seus componentes e da interação biológica de cada um deles, caracterizando-as de acordo com a principal atividade: neurotóxico presente na peçonha da cobra-coral (*Micrurus*) e cascavel (*Crotalus*) (Moreira et al., 2008); vasculotóxico, presente na peçonha da jararaca (*Bothrops jararaca*); miotóxico presente na peçonha da jararacussu (*Bothrops jararacussu*) (Varanda e Giannini, 1994).

Os constituintes protéicos dos venenos são classificados principalmente como enzimas. Além dos componentes protéicos, estão presentes os não-protéicos, divididos em orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos são classificados em aminoácidos livres, peptídeos, nucleotídeos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas. Os inorgânicos são representados por cátions e íons (Varanda e Giannini, 1994).

Enzimas com atividade fosfolipásica A_2 são comumente encontradas nos venenos das famílias Hydrophidae, Elapidae e Viperidae. Existem mais de 280 PLA₂ que foram seqüenciadas (Danse et al., 1997; Tan et al., 2003). Apesar de exibirem diferentes propriedades farmacológicas compartilham 40 a 99% de semelhança na seqüência de aminoácidos e semelhanças nas estruturas terciárias (Scott, 1997; Belo et al., 2005; Sai - Ngam et al., 2008).

A atividade proteolítica dos venenos pode ser caracterizada como serino ou metaloproteases, endopeptidases, exopeptidases, collagenases e elastases. As proteases levam a sérios efeitos como hemorragias, causadas por toxinas hemorrágicas (Varanda e Giannini, 1994).

Entre os componentes protéicos isolados de venenos ofídios, alguns se tornaram úteis na terapêutica, como é o caso do ativador do fator X da coagulação sanguínea, isolado do veneno da víbora de Russell, *Daboia (Vipera) russelli*, que permite dosar o fator X plasmático humano (Bachman, et al., 1959; Denson, 1961; Aurell et al., 1977).

Maurício Rocha e Silva, Gastão Rosenfeld, e Wilson Beraldo, no ano de 1949, descreveram a existência da bradicinina, um agente farmacologicamente ativo liberado no plasma após a exposição ao veneno da *Bothrops jararaca*. Este agente é um peptídeo de baixo peso molecular causador da hiperemia e permeabilidade vascular. Esta descoberta mais tarde foi usada para o tratamento da hipertensão, pois este fator potencializador de bradicinina (“bradykinin - potentiating factor”, BPF), atua ainda abolindo a conversão da angiotensina I em angiotensina II, por inibir a enzima conversora da angiotensina (ECA), (Ferreira, 1965; Ferreira e Vane, 1967; Bakhle, 1968; Ondetti et al., 1971; Cushman et al., 1977; Sant’Anna, 2007), muitas outras frações purificadas e ou peptídeos estão sendo estudados, por terem importância terapêutica relevante.

1.2-Atividades das peçonhas do gênero *Bothrops*

Grande número de acidentes ofídicos diagnosticados nas Américas é causado principalmente pelas serpentes do gênero *Bothrops* (Brasil, 1998; Pinho e Pereira, 2001). O envenenamento é semelhante a um trauma agudo, no qual a vítima goza de perfeita saúde e dentro de algumas horas após a picada pode chegar a óbito (Malgarejo, 2003).

Os compostos que caracterizam tais venenos em geral são proteínas algumas com atividades enzimáticas com propriedades tóxicas ou não. De forma didática, podemos destacar nestes venenos três atividades principais (França e Málaque, 2003):

I- COAGULANTE: A atividade coagulante se dá pela ação de proteinases, que agem sobre o fibrinogênio, protrombina, fator X e plaquetas. O tempo de coagulação pode ser prolongado, parcialmente coagulável ou incoagulável, devido ao consumo de fibrinogênio e outros fatores da coagulação. No consumo do fibrinogênio, formam-se coágulos de fibrina, que são depositados em capilares, arteríolas e posteriormente removidos pelo sistema fibrinolítico (Nahas et al., 1964; Nahas, Kamiguti, et al., 1979; Sano-Martins e Santoro, 2003).

II- PROTEOLÍTICA: Devida à ação de proteases, que leva a necrose tecidual e ao edema inflamatório, resultando na amplificação do processo inflamatório pela liberação de autacóides endógenos (bradicinina, serotonina, histamina), que podem estar relacionados às manifestações sistêmicas como a hipotensão (Mebis, 1970; Brazil, 1911; Rosenfeld, 1965; Jorge e Ribeiro, 1989; França e Málaque, 2003; Moreira et al., 2008; Sitprijia, 2008).

III- HEMORRÁGICA: Esta atividade pode ser a principal causa das hemorragias sistêmicas que ocorrem em vítimas acidentadas por estas serpentes. A hemorragia causada pelos venenos botrópicos se instala logo após a picada (Gutiérrez et al., 1987). As proteínas com estas atividades são caracterizadas por hemorraginas. As hemorraginas são metaloproteinases que agem independente da ação coagulante do veneno (Queiroz et al., 1985; Ohasaka, 1979). Muitas das hemorraginas foram descritas e caracterizadas nos venenos botrópicos: *Bothrops asper* (Aragon-Ortiz e Gubensek, 1987; Rucavado et al., 1995; Franceshi et al., 2000) *Bothrops jararaca* (Mandelbaum et al., 1976; 1984; Queiroz et al., 1985; Muruyama et al., 1992; 1993; Kamiguti et al., 1996) *Bothrops moojeni* (Assakura et al., 1985), *Bothrops neuwiedi* (Mandelbaum et al., 1984), *Bothrops lanceolatus* (Lôbo de Araújo et al., 1990; Stroka et al., 2005). São responsáveis ainda pela formação das equimoses disseminadas ou

centralizadas no local da picada, levando ao extravasamento do sangue dos capilares para o interstício da região ferida (Rosenfeld, 1976).

As reações inflamatórias induzidas pelos venenos botrópicos ocorrem devido à defesa do organismo em resposta a estímulos nocivos, envolvendo interações entre células do sangue e do tecido lesado (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez e Lamonte, 1989), podendo ser causado também pela toxina atuando em seu sítio ativo. Estas reações inflamatórias são acompanhadas por edema, intenso dano tecidual local e efeitos sistêmicos, tal como as hemorragias, coagulopatias, falência renal, choque, efeitos cardiovasculares, os quais podem ser letal (Thomas et al., 1995).

Muitos dos efeitos apresentados pelas peçonhas são ocasionados pelas fosfolipases A_2 . As fosfolipases A_2 exercem atividade hidrolítica sobre o carbono β (C2). A atuação sobre as membranas celulares ocorre devido à atração eletrostática e formação de lisofosfolípidios. A hidrólise de fosfolípidios pode levar a liberação de ácido araquidônico e a síntese de eicosanóides, contribuindo na miotoxicidade, cardiotoxicidade, neurotóxicidade, formação de edema e indução de mionecrose, estão relacionadas ainda à reação inflamatória aguda e a atividade anticoagulante presente em alguns venenos (Kaiser et al., 1990; Lobo de Araújo et al., 2001; Dal Pai e Neto, 1994; Varanda e Giannini, 1994; França e Maláque, 2003; Arruda et al., 2003; Gutiérrez et al., 1984; 2003; Martins, 2006; Cogo et al., 2006; Abreu et al., 2007; Montecucco et al., 2008; Moreira et al., 2008).

Como descrito anteriormente as peçonhas botrópicas são caracterizadas por possuírem atividade proteolítica sobre substratos protéicos como a caseína, colágeno, elastina, fibronectina, laminina, fibrinogênio e atividade esterásica sobre substratos sintéticos como TAME, BAEE e LEE. Esta atividade pode estar associada à coagulação, com hidrólise de ésteres de arginina, resultando na degradação de uma ou mais cadeias do fibrinogênio (α , β e γ),

participando, portanto do processo de inflamação aguda com a formação de trombos na microvasculatura, com conseqüente hipóxia agravando o edema e a necrose tecidual. Outras proteinases podem atuar na degradação de componentes da matriz extracelular dos vasos, rompem à integridade do endotélio vascular, evidenciando ataque proteolítico da lâmina basal como é o caso das metaloproteases, que promovem o extravasamento de sangue para fora do vaso gerando as hemorragias (Kirby et al., 1979; Stocker et al., 1982; Hofmann H e Bom C, 1987b; Meier et al., 1988; Dal Pai e Neto, 1994; Lôbo de Araújo et al., 1998; França e Maláque, 2003; Sano-Martins e Santoro, 2003; Escalante et al., 2006; Pérez et al., 2007; 2008).

Alguns venenos botrópicos possuem pequenas diferenças em relação aos demais devido ao local onde as serpentes são endêmicas, como a *Bothrops insularis*, na ilha da Queimada Grande, na Costa do Brasil, *Bothrops caribbaeus*, na Ilha de Santa Lúcia nas Antilhas, *Bothrops lanceolatus*, na Ilha da Martinica no mar do Caribe (Figura 1) (Camey et al., 2002; Wuster et al., 1997; Numeric et al., 2002; Campbell e Lamar, 1989; Gutiérrez et al., 2008).

A *Bothrops lanceolatus*, descrita pela primeira vez por Lacépède, em 1789, é uma serpente de grande porte, que tem por habitat as regiões úmidas das florestas tropicais, tendendo a ser arborícola. O veneno desta serpente se assemelha aos das *Bothrops* brasileiras em muitas das suas atividades. O envenenamento por esta espécie leva a efeitos locais e sistêmicos que incluem embolia pulmonar, enfarto do miocárdio e enfarto cerebral, trombocitopenia e coagulação intravascular disseminada (Lôbo de Araújo et al., 1998; Thomas et al., 1995).

O veneno da *Bothrops lanceolatus*, como já mencionado, possui muitas das atividades das *Bothrops* brasileiras nos incentivando a estudar este veneno sob alguns aspectos.

A atividade edematogênica está associada à ação de proteinases. Foi investigado no veneno da *Bothrops lanceolatus* sua habilidade na formação de edema em ratos, camundongos e os mediadores envolvidos. Em ratos, o edema

se mostrou dose e tempo dependente, acompanhado por hemorragia, sendo abolida após o aquecimento do veneno. Observou-se também a liberação de metabólitos do ácido araquidônico, bradicinina, histamina e serotonina (Guimarães et al., 2004; Faria et al., 2001). A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos ocorreu também de forma dose e tempo dependente e quando aquecido o veneno verificou-se a redução da migração e da atividade fosfolipásica. Drogas antiinflamatórias como a dexametasona, inibiram parcialmente a migração de neutrófilos, sugerindo que metabólitos do ácido araquidônico pela via da lipooxigenase estão envolvidos no processo (Arruda et al., 2003).

O edema e o aumento da permeabilidade vascular em camundongos induzida pelo veneno da *Bothrops lanceolatus* ocorreu com extenso infiltrado de células inflamatórias principalmente neutrófilos (Lôbo de Araújo et al., 2000). O imunesoro específico para o veneno da *Bothrops lanceolatus*, foi pouco eficaz em prevenir o edema (Faria et al., 2001).

A atividade do veneno da *Bothrops lanceolatus* sobre a coagulação foi estudada com base em relatos de síndromes trombóticas e outras coagulopatias (Estrade et al., 1989; Thomas et al., 1994; 1995; 1998). Testes *in vitro* demonstraram que o veneno da *Bothrops lanceolatus* apresenta efeito coagulante sobre o fibrinogênio de forma dose e concentração dependente, indicando a presença de enzimas tipo-trombina. De fato, foi isolado deste veneno uma enzima fibrino(geno)lítica com ação hidrolítica sobre a cadeia alfa e beta do fibrinogênio (Lôbo de Araújo et al., 1998).

A coagulação do fibrinogênio induzida pelo veneno foi inibida pela adição de plasma humano, indicando a presença de inibidores plasmáticos inespecíficos (Lôbo de Araújo et al., 2001). Outros venenos botrópicos atuam sobre a coagulação ativando o fator II ou X da cascata da coagulação gerando trombina (pró-coagulante) ou então hidrolisando diretamente o fibrinogênio em fibrina (trombina-símile) (Sano-Martins e Santoiro, 2003). A fosfolipase A₂ (PLA₂) purificada do veneno da *Bothrops lanceolatus* (Lôbo de Araújo et al., 1994)

prolonga o tempo de tromboplastina parcialmente ativada no plasma humano indicando a atividade anticoagulante desta enzima (Lôbo de Araújo et al., 2001)

Como já descrito nos envenenamentos botrópicos as hemorragias são muito comuns e causadas por metaloproteínases. Do veneno da *Bothrops lanceolatus*, foi purificada uma metaloproteínase hemorrágica (BlaH1), com peso molecular de 28 kDa, e atividades: hemorrágica, caseinolítica, fibrinogenolítica, colagenolítica e elastinolítica, exceto fosfolipásica. As atividades, hemorrágica e caseinolítica foram inibidas com EDTA, indicando ser estas atividades íons-dependente. A atividade hemorrágica desta proteína foi neutralizada pelo imunesoro específico (Stroka et al., 2005).

Outra proteína com cadeia polipeptídica de 27.5 kDa, e atividade caseinolítica, foi isolada do veneno da *Bothrops lanceolatus* e é capaz de induzir bloqueio neuromuscular em aves e despolarizar músculo diafragma isolado de ratos (Lôbo de Araújo et al., 2002).

1.3- Envenenamentos ocasionados pela *Bothrops lanceolatus*

O número de vítimas acometidas por picadas da *Bothrops lanceolatus* é de aproximadamente 13 acidentes por ano, registrados nos hospitais da Ilha da Martinica, apresentando sintomas similares aos causados pelas *Bothrops* brasileiras, com algumas particularidades (Thomas et al., 1995; Thomas e Tyburn, 1996; França e Málaque, 2003).

Em praticamente todos os relatos de acidentes causados por esta serpente, descreveram a presença de edema, dores e em alguns casos coagulopatias, trombooses severas que podem se desenvolver distantes do local da picada, como embolia pulmonar, enfarto cerebral, enfarto do miocárdio. No caso de trombose sistêmica, as vítimas podem ficar debilitadas permanentemente (Estrade et al., 1989; Thomas e Tyburn, 1996; Thomas et al., 1995; 1998; 2006; Merle et al., 2005; Malbrancque, et al., 2008). O mecanismo,

pelo qual ocorre trombose permanece desconhecido (Numeric et al., 2002). Foi observado que após tratamento de embolia pulmonar com heparina, desenvolveu-se coagulação intravascular disseminada, indicando a presença de enzimas tipo trombina neste veneno. O uso de imunesoro específico surgiu como uma possível solução para o tratamento das complicações causadas por este veneno (Estrade et al., 1989).

Os métodos iniciais para a prevenção de trombozes ocasionadas pelo veneno da *Bothrops lanceolatus* se baseavam na administração de anticoagulantes (Estrade et al., 1989; Thomas et al., 1995). Nos hospitais da Ilha da Martinica, para o atendimento de vítimas picadas por esta serpente foi desenvolvido um protocolo para tratamento destes envenenamentos e os resultados clínicos monitorados continuamente (Thomas et al., 2006). Este protocolo classificava os envenenamentos pela severidade, priorizada pelos sinais locais e monitorado através de ensaio imunoenzimático (ELISA) que dosava os níveis de veneno no soro das vítimas. Podendo assim, padronizar o tratamento das vítimas com a quantidade adequada de imunesoro. Nos casos mais leves, as vítimas não recebiam o imunesoro devido aos possíveis efeitos adversos, como hipersensibilidades ocasionadas pelos imunesoros de origem eqüina. Esta medida resultou na melhoria do tratamento dos envenenamentos (Bucher et al., 1997; Rodriguez-Acosta et al., 1998; Thomas et al., 1995; 1998).

O tratamento com a soroterapia logo após a picada mostrou a recuperação de até 100% das vítimas (Thomas et al., 1998), embora Merle et al., (2005) relataram o caso de uma vítima que após ser picada recebeu precocemente a soroterapia e desenvolveu complicação visual, identificado como enfarto occipital.

Três novos casos de infarto cerebral foram descritos em pacientes que receberam precocemente a soroterapia, levando os pesquisadores a testarem o imunesoro quanto a sua eficácia e constataram a perda de reatividade dos antivenenos. A partir daí, foi sugerido produzir um antiveneno com maior eficácia, que pudesse inclusive ser usado também para tratamento de acidentes causados

pela serpente *Bothrops caribbaeus* endêmica da Ilha de Santa Lúcia, a qual produz síndromes trombóticas semelhantes ao produzido pelo veneno da *Bothrops lanceolatus*. (Thomas et al., 2006; Numeric et al., 2002; Gutiérrez et al., 2008).

A prevenção dos efeitos fisiopatológicos nos envenenamentos envolvendo a *Bothrops lanceolatus* na Ilha da Martinica continua sendo feito com a soroterapia (Thomas et al., 1995; 1998; 2006). Em razão da diversidade de efeitos destes venenos acreditamos ser fundamental produzir um antiveneno com maior especificidade e potência na tentativa de melhorar e controlar os efeitos ocasionados pela picada dessa serpente.

1.4- Sistema imunológico e peçonhas ofídicas

O sistema imunológico dos mamíferos é muito estudado devido a sua importância na compreensão de mecanismos da resposta imune. A resposta imune é classificada como inata e adquirida. A inata é realizada por células como os polimorfonucleares, os macrófagos, as barreiras físicas e químicas como a pele e o pH; já a adquirida é mediada exclusivamente pelos linfócitos B e T (Abbas e Lichtman, 2005).

A principal função do sistema imunológico é de discriminar e reagir frente à diversidade de patógenos, substâncias estranhas e ao que lhe é próprio mantendo assim a homeostasia. Esta característica está relacionada aos linfócitos T e B. A resposta imune é controlada por imunoglobulinas, complexo principal de histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) e receptores de células T (TCR - *T cell receptors*) (Owen e Lamb, 1989). Existe ainda a dependência de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os intrínsecos estão relacionados à acessibilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e a mobilidade do antígeno; já os extrínsecos dependem de fatores ligados ao hospedeiro, como tolerância ao antígeno, os fatores genéticos, a rede idiotípica (Jerne, 1974;

Araújo et al., 1987; Coutinho, et al., 1987). De acordo com estes fatores a resposta imune poderá ser positiva com produção de anticorpos, células de memória e outros, ou negativa sem o reconhecimento do antígeno (tolerância ou imunossupressão) (Abbas e Lichtman, 2005).

A imunossupressão é uma deficiência ou anergia de uma ou mais funções do sistema imunológico. Entre as substâncias de ordem extrínseca se destacam os fármacos citotóxicos (azatioprina, ciclofosfamida); corticosteróides (prednisona) que são potentes inibidores da resposta inflamatória; os que interferem na sinalização e expansão clonal dos linfócitos T (ciclosporina, FK506, rapamicina) são exemplos de imunossupressores. Existem ainda fatores relacionados ao antígeno como via de inoculação, estrutura, dose e frequência (Imboden et al., 2004; Abbas e Lichtman, 2005).

Os fatores intrínsecos foram mais bem conhecidos a partir de estudos nas doenças auto-imunes e imunodeficiências congênitas. Os mecanismos se baseiam em três etapas da resposta imune; interação das células apresentadoras de antígeno (APCs) e linfócitos T, cooperação de células B e T e produção de imunoglobulinas.

O defeito na interação APCs e linfócitos T, pode estar relacionado ao gene MHC das APCs (Griscelli e Lisowsky-Giospierre, 1989), como associado à falta ou à deficiência de CD3 nas células T. A quantidade de citocinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e INF- β também influenciam na diferenciação de macrófagos e linfócitos T, logo a ausência ou a deficiência de algumas destas interleucinas podem causar anergia ou supressão da resposta imune (Fischer, 1993; Imboden et al., 2004;).

A deficiência na cooperação entre células B e T, ocorre principalmente na ausência ou defeito na expressão de moléculas de superfície que podem levar a perda de ativação das células T ou a falta de diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos. Qualquer deficiência na ativação dessas moléculas leva a perda de reatividade das células T, podendo assim ter produção de linfocinas e proliferação celular deficiente (Laman et al., 1994).

Fatores ambientais também podem levar a uma resposta imune positiva ou negativa, pois o ambiente é um fator de expressão fenotípica.

O mecanismo de ativação do sistema imune é semelhante em todos os mamíferos, onde são encontradas as imunoglobulinas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Nos eqüinos (animais de grande porte que são utilizados na produção de soros para uso terapêutico), não foi ainda detectada a IgD e quanto a IgG, é subdividida em IgGa, IgGb, IgGc e a IgGt, sendo que esta última presente em maior quantidades na produção de imunesoros antitóxicos e é rica em polissacarídeos (Fernandes et al., 2000).

Como já descrito, as peçonhas ofídicas possuem grande diversidade de efeitos fisiopatológicos. Porém diferem quanto à composição e ação que variam entre as famílias e as espécies.

Desde o início do século XX, Vital Brazil constatou que os soros antiofídicos provenientes da Europa produzidos por Calmette, não neutralizavam os efeitos dos venenos das serpentes brasileiras, e nem os soros produzidos para as serpentes brasileiras eram passivos de neutralização entre os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (Brazil, 1901). Em 1904, evidenciou-se pela primeira vez através de reação de precipitação a presença de componentes comuns entre os venenos de *Naja naja* e de *Echis carinatus* (Lamb e Hanna, 1904). Técnicas como, imunodifusão em gel de agarose (Oudin, 1952), ELISA (Engvall e Perlmann, 1972), possibilitaram o aprofundamento do conhecimento neste sentido, inclusive demonstrando reações cruzadas entre os venenos de diversas espécies.

O estudo de reações cruzadas entre venenos de serpentes brasileiras contribuiu na formulação de antígenos utilizados para a imunização de eqüinos na produção de imunesoros antiofídicos (Dias da Silva et al., 1989).

Levando em conta o sistema imunológico destes animais pouco se sabe sobre a ação das peçonhas sobre ele. Contudo, a presença de qualquer elemento nos venenos que atue como imunossupressor, é um forte responsável

pela diminuição de potências dos imunesoros. Até o momento existem poucos relatos sobre o mecanismo de atuação dos venenos ou de suas toxinas sobre o sistema imune de animais, e que a maior parte deles quando sugeridos são apenas especulativos.

Alguns trabalhos começaram a relatar a ação dos venenos ou de suas toxinas sobre o sistema imune analisando a produção de anticorpos. Dos-Santos et al., (1986) pesquisando o veneno de *Crotalus durissus terrificus* imunizaram camundongos com uma subunidade da crotoxina (principal componente deste veneno), a fosfolipase A₂ e obtiveram altos títulos de anticorpos. Mais tarde, analisaram a atividade deste veneno sobre o sistema imune de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro e verificaram uma redução no título de anticorpos, sugerindo então que o veneno ou a crotoxina eram responsáveis por esta redução (Santos et al., 1988). Estes achados foram confirmados posteriormente por Higashi et al., (1989) que utilizaram apenas a fosfolipase A₂, como imunógeno para a produção de imunesoro em eqüinos, o qual foi capaz de neutralizar a atividade letal do veneno total.

Cardoso e Mota (1997) também analisaram o efeito do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades: CA (ácida não-tóxica) e CB (fosfolipásica básica), sobre o sistema imune humoral e celular de camundongos. Eles observaram que a resposta imune humoral era reduzida tanto com o veneno total quanto com a crotoxina, mas não com as suas subunidades, sugerindo que o efeito inibitório é devido à presença da molécula intacta do veneno. Com relação à resposta imune celular o efeito inibitório não foi observado. Estes resultados sugerem uma possível ação moduladora deste veneno sobre os macrófagos que podem induzir um efeito inibitório na subclasse TH₂, causando a diminuição da produção de anticorpos, mas poupando a subclasse TH₁, com a preservação da reação de sensibilidade de contato.

Rangel-Santos et al., (2004) também demonstraram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* e a crotoxina apresentam efeito inibitório na proliferação das células esplênicas, e reafirmaram que a integridade da molécula é

indispensável para o desenvolvimento deste fenômeno. Sugeriram também que o veneno ou a crotoxina induzem a liberação de substâncias que poderiam modificar a composição do microambiente interferindo com a capacidade dos macrófagos em processar e apresentar antígenos para os linfócitos B podendo levar a um fenômeno supressivo parecido com o exercido pelo linfócito T regulatório.

Stephano constatou o efeito imunossupressor do veneno de *Lachesis muta muta* e algumas de suas frações sobre o sistema imune humoral de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro. De posse dessas informações imunizou eqüinos com as frações livre do efeito supressor, obtendo um imunesoro com capacidade de neutralização da atividade letal pelo menos cinco vezes superior ao obtido com o veneno total desta serpente (Stephano et al., 2005).

Uma neurotoxina (Cobratoxin) obtida do veneno de uma serpente da Tailândia (*Naja naja siamensis*) tem demonstrado várias atividades farmacológicas, inclusive potente atividade imunossupressora em modelos animais de doenças crônicas e severas, utilizada após tratamento (detoxificação química da proteína) para minimizar os efeitos locais (Reid, 2007).

Martinelli et al., (1978a) descreveram o efeito imunossupressor induzido pelo Fator de Veneno de Cobra (*Cobra Venom Factor* = CVF), que é uma glicoproteína extraída do veneno de *Naja naja*, que possui este efeito verificado apenas para antígenos T-dependentes. O veneno de *Naja melanoleuca* também contém uma proteína semelhante ao CVF (Tambourgi et al., 1992). O CVF atua sobre o componente C3 do sistema complemento (Cochrane et al., 1970) de modo a consumi-lo em um curto espaço de tempo (Kolln et al., 2007) e leva a uma hipogamaglobulinemia (Gewurz et al., 1966). Bottger et al., (1986) demonstraram que a supressão da resposta imune humoral é ocasionada pelo CVF, devido à depleção do componente C3 do sistema complemento. Esta regulação da resposta imune em função da depleção do componente C3 do complemento ainda não está bem esclarecida, pois o componente C3 do sistema complemento faz parte de ambas as vias de ativação da cascata (clássica e alternativa)

(Weiler e Hobbs, 1987). Estas características fazem com que a proteína seja constantemente estudada (Vogel et al., 2004; 2007).

Também foi isolada do veneno de *Naja oxiana* (serpente endêmica da Ásia Central) uma proteína básica a Oxiagin, com peso molecular 49,8 kDa, capaz de inibir a via clássica do sistema complemento, atuando em diversos estágios desta via, inibindo a formação do C3-convertase (Shoibonov et al., 2005).

As serpentes no Brasil não apresentaram, em seus venenos, proteínas relacionada, imunologicamente ao CVF (Calich et al., 1977). A atividade imunossupressora dos venenos pode estar relacionada ainda à competição antigênica (Boquet, 1979).

1.5- Soroterapia

A soroterapia é o procedimento clínico mais acertado no tratamento dos acidentes ofídicos (Sullivan et al., 1986). No Brasil, o nascimento da soroterapia, começa com a história de um ilustre pesquisador Vital Brazil, nascido na cidade de Campana, em Minas Gerais, a 28 de abril de 1865, após vários obstáculos e árduo sacrifício formou-se em medicina, trabalhando inicialmente como médico sanitaria do estado de São Paulo, onde acompanhou equipes no combate de moléstias contagiosas. Estabeleceu-se na cidade de Botucatu e atuando como médico clínico, deparou-se com grande número de pessoas picadas por serpentes peçonhentas. Nesta época, não existiam tratamento eficaz para os envenenamentos ofídicos. Vital Brazil desejando resolver o problema de imediato testou ervas, extratos, e todos os outros tratamentos utilizados pela população local, convencendo-se que eram ineficazes. Mudando-se para São Paulo e trabalhando juntamente com Adolfo Lutz no Instituto Biológico viu a possibilidade de continuar seu trabalho na tentativa de obter um tratamento adequado para os envenenamentos ofídicos (Búcher, 1980).

No final do século XIX, o francês Leon Charles Albert Calmette (1863 - 1933), inspirado na descoberta da antitoxina diftérica por Emil Von Behring, produziu um imunesoro contra o veneno de *Naja tripudians* (Calmett, 1894). Em 1895, este imunesoro foi utilizado em humanos, revolucionando o tratamento de pessoas picadas por serpentes. Calmette estava convencido de que o imunesoro produzido por ele era capaz de neutralizar todas as peçonhas (Sant'Anna, 2007). Quando em 1897, Vital Brazil utilizou o imunesoro produzido por Calmette na tentativa de neutralizar os efeitos provocados pelas peçonhas brasileiras, os testes demonstraram a ineficácia do imunesoro de Calmette frente aos venenos de serpentes brasileiras (Búcher, 1980).

A partir daí, Vital Brazil resolveu produzir imunesoros contra *Bothrops jararaca* e contra *Crotalus durissus terrificus*, verificando que os venenos de serpentes apresentavam especificidade antigênica. O conceito de especificidade antigênica foi posteriormente comprovado pelo francês Nicolas Maurice Arthus (1862 - 1945), como também por Karl Landsteiner (1868 - 1943). Os estudos de Vital Brazil tornaram-se definitivos em relação ao conceito de especificidade. Vital Brazil também foi o primeiro a produzir imunesoro polivalente para uso terapêutico (Sant' Anna, 2007).

As peçonhas ofídicas por serem ricas em proteínas são consideradas bons imunógenos. Vários imunesoros são produzidos em eqüinos com venenos de diversas espécies de serpentes inclusive as do gênero *Bothrops*. Existem na América do Sul alguns centros responsáveis pela produção e distribuição destes imunesoros, como a Fundação Ezequiel Dias em Minas Gerais (FUNED), Instituto Butantan em São Paulo (Camey et al., 2002; Fernandes et al., 2000; Cardoso et al., 2003). Para caracterizar a qualidade de um imunesoro são observados critérios como a capacidade de neutralização de seus efeitos tóxicos. Em relação aos venenos botrópicos são observados a neutralização das atividades, hemorrágica, necrosante, proteolítica, coagulante e fibrinolítica (Camey et al., 2002).

Os imunesoros são produzidos a partir de um “pool” de alguns venenos, favorecendo em parte o tratamento, já que na maioria das vezes não é identificada a serpente causadora do envenenamento. Alguns autores fizeram comparações entre os imunesoros polivalentes, monovalentes e avaliaram a capacidade de neutralização de toxinas e atividades enzimáticas dos venenos de algumas espécies, observando falhas nesta neutralização (Bogarín et al., 1995). Há uma preocupação atual em se produzir imunesoros que neutralizem atividades específicas dos venenos, como também a sua qualidade (Thomas, 1995).

As reações cruzadas entre venenos podem estar relacionadas com a similaridade antigênica, distribuição geográfica e a adaptação que cada espécie sofreu (Wuster et al., 1997; Beghinj et al., 2005), como também o tamanho da molécula utilizada como imunógeno (Moura da Silva et al., 1990; Dias da Silva, 1989). A diversidade de epítomos presentes nas peçonhas ofídicas influencia a produção de imunesoros quanto à imunogenicidade, que pode ser aumentada com o uso de adjuvantes (Cardoso et al., 2003; Grossman e Terr, 2004). A maioria dos imunesoros comerciais preparados em eqüinos, possui em maior quantidade imunoglobulinas do tipo IgG (Bucher et al., 1997; Fernades et al., 2000).

Outra característica dos imunesoros produzidos em eqüinos é o número de proteínas heterólogas administradas nos pacientes. Estas podem desencadear reações de hipersensibilidade como as manifestadas pela formação de “complexos imunes”, causando uma doença conhecida como “doença do soro”. Alguns pacientes podem apresentar início de choque anafilático, devido a presença do alérgeno (Thomas et al., 1995; Wen, 2003; Abbas, 2005; Bucarechi et al., 2007).

Existem relatos de animais naturalmente imunes a picadas de serpentes peçonhentas. Vital Brazil e Bruno Rangel Pestana verificaram que o soro normal de várias espécies animais era capaz de neutralizar a atividade letal dos venenos ofídicos, o que foi confirmado mais tarde por Gastão Rosenfeld e Jean Vellard. Vital Brazil e Rangel Pestana demonstraram ainda a neutralização exercida pelo soro normal das serpentes sob seus próprios venenos e de outras

serpentes, mesmo não peçonhentas como é o caso da *Pseudoboa cloelia* conhecida popularmente como muçurana, provavelmente por ser esta serpente predadora de outras serpentes inclusive as venenosas (Brazil, 1914).

Fato semelhante ocorreu com o soro normal de gambá (*Didelphis marsupialis*), que foi altamente eficaz na neutralização das atividades hemorrágica e proteolíticas do veneno da *Bothrops lanceolatus* (Pifano et al., 1993) e da atividade neurotóxica do veneno de *Crotalus vegrandis*. (Rodriguez-Acoasta et al., 1995; Salgueiro et al., 2001). Extratos vegetais e ou frações do mesmo também são estudados e testados quanto à neutralização das atividades de peçonhas (Soares et al, 2005; Chatterjee et al, 2006; Cavalcante et al., 2007; Vale, 2008; Mendes et al., 2008; Mahadeswaraswamy et al., 2008)

A partir destas observações os animais e seus sistemas imunes foram estudados quanto a influencia das peçonhas sobre a produção de anticorpos inclusive os soros produtores. Camundongos tratados com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* reduzem a produção de anticorpos quando imunizados com eritrócitos de carneiro (Dos-Santos et al., 1986), o mesmo ocorreu com a peçonha de *Lachesis muta muta*. Quando identificadas e separadas as frações do veneno responsáveis pela redução na produção de anticorpos, animais foram imunizados e produziram um imunesoro com a capacidade neutralizante bem maior, se comparado ao produzido com a peçonha bruta (Stephano et al., 2005).

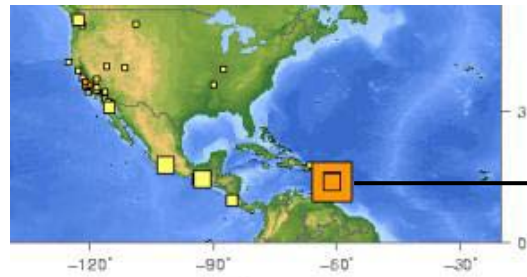
Todos estes conhecimentos nos incentivaram a estudar o veneno de *Bothrops lanceolatus* e suas frações, bem como identificar componentes mais imunogênicos na tentativa de obter um imunesoro mais eficaz e com melhor especificidade.

A

www.martinique.ecologie.gouv.fr

B

www.globalgeografia.com

C

www.gluon.com.br

Figura 1- A- Serpente *Bothrops lanceolatus* (Lacépède, 1789).

B- Ilha da Martinica Área de 1100 Km², População: 400.000 em janeiro/2005 (www.globalgeografia.com).

C- Mar do Caribe - América Central.

2- OBJETIVOS

- Analisar os efeitos da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e suas frações sobre o sistema imune humoral de camundongos imunizados com antígenos sem relação antigênica (Eritrócitos de Carneiro);
- Selecionar a fração sem efeito inibitório sobre o sistema imune humoral de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro e utilizá-la como imunógeno em coelhos;
- Analisar os imunesoros (comercial e produzido em coelhos), quanto à neutralização das atividades hemorrágica, hemolítica, caseinolítica, esterásica e coagulante da peçonha da *Bothrops lanceolatus*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1.- Animais

3.1.1- Camundongos

Camundongos Swiss machos, provindos do Centro de Bioterismo (CEMIB) da Unicamp, com idade aproximada de 4 semanas, pesando entre 18 - 20 gramas, foram mantidos em biotério (S.P.F. [Specific Pathogens Free]) do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia (IB - Unicamp).

3.1.2- Coelhos

Coelhos adultos, machos, raça Nova Zelândia Branco, provindos da granja Angolana de São Roque - São Paulo, com idade de 2 meses, mantidos no Núcleo de Medicina Experimental (NMCE), em Biotério convencional pertencente ao Departamento de Farmacologia (FCM - Unicamp).

3.2- Peçonhas

3.2.1- *Bothrops lanceolatus*

A peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) foi gentilmente cedido pela “Unité des Venins” Institut Pasteur, (Paris - França). A solução mãe do veneno foi dissolvida em salina 0,9%, tamponada com fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS). Alíquotas foram utilizadas para testes *in vitro* e *in vivo*. Para o teste ELISA preparou-se uma solução na concentração de 10µg/mL em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0.1M, pH 9.6.

3.2.2- *Bothrops jararaca*

Venenos de *Bothrops jararaca*, de origem do laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Farmacologia (FCM-UNICAMP). A solução mãe do veneno foi dissolvida em salina 0,9%, tamponada com fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS). Alíquotas foram utilizadas para testes *in vitro*. Para o teste ELISA, preparou-se uma solução na concentração de 10µg/mL em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0.1M, pH 9.6.

3.3- Fracionamento da peçonha da *Bothrops lanceolatus*

3.3.1- Cromatografia de exclusão em Sephadex G-100

Inicialmente a peçonha da *Bothrops lanceolatus* (200mg) foi utilizada para a realização da cromatografia, sendo suspensa em tampão Tris-HCl, 50mM, pH 7,5 (Tampão "A"), para a concentração de 40mg/mL. Após 15 minutos de repouso a 4°C, a solução foi centrifugada a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aplicado em coluna (1,2 x 75 cm) de Sephadex G-100 equilibrada previamente com tampão "A" O material foi eluído a 4°C, utilizando-se fluxo de cinco mL/h , coletando-se amostras de 1,5 mL por tubo. A concentração protéica das amostras foi estimada através da leitura a 280nm em espectrofotômetro. As amostras foram submetidas aos ensaios enzimáticos e biológicos, sendo a seguir, agrupadas em três frações (FI, FII e FIII), de acordo com as atividades nelas contidas. Cada fração, assim agrupada, foi dialisada contra água destilada durante 24 horas a 4°C e liofilizada.

3.3.2. Frações da peçonha da *Bothrops lanceolatus*.

As frações obtidas através de cromatografia foram dissolvidas em salina 0,9%, tamponada com fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS). Alíquotas foram utilizadas para testes *in vitro* e tratamentos *in vivo*.

3.4- Reagentes

3.4.1- Imunesoro comercial anti - *Bothrops lanceolatus*

O imunesoro específico para a peçonha da *Bothrops lanceolatus* foi gentilmente cedido pelo Instituto Pasteur - Unité des Venins - Paris, França. (sérum anti-*Bothrops lanceolatus*, BO 278), o qual foi liofilizado para manter as suas propriedades biológicas.

3.4.2- Adjuvante

Adjuvante Completo de Freund (cada 1mL contem 1mg de *Mycobacterium tuberculosis*), (H 37 Ra, ATCC 25177), (morto pelo calor e seco) heat killed end dried, 0,85 mL de óleo de parafina e 0,15 mL de mannide monocleate. (Sigma[®] Chemical Company, Lot 49F-8800).

Adjuvante Incompleto de Freund (emulsão óleo em água), 0,85 mL de óleo de parafina e 0,15 mL de mannide monocleate. (F5506, Sigma[®] Chemical Company, Lot 60K8937).

3.5- Antígenos

3.5.1- Eritrócito de carneiro para imunização em camundongos

Para determinação da resposta imune dos camundongos frente ao efeito do veneno de *Bothrops lanceolatus* foi utilizado o antígeno (não relacionado ao veneno) eritrócitos de carneiro (EC em Alsever estéril) de procedência do Biotério Boa Vista (Biotério Boa Vista, Produto isento de registro pela ANVISA, Hemácia ovina em Alsever estéril, Ht: 30% com volume de 50mL). Após lavar por três vezes em salina (PBS, 0,1M, pH 7,2), padronizada espectrofotometricamente ($\lambda = 550 \text{ nm}$). Os camundongos receberam a dose de 5×10^8 /células em 0,2mL em solução salina tamponada (PBS, 0,1M, pH 7,2) por via intraperitoneal.

3.5.2- Fração II da *Bothrops lanceolatus* para imunização em coelhos

Utilizou-se a fração II (FII) da peçonha da *Bothrops lanceolatus*, como imunógeno através de esquemas de imunização em coelhos a fim de produzir imunesoro para neutralização do veneno total. A solução da FII foi preparada a partir de 1mg dissolvido em Adjuvante Completo de Freund na primeira dose. Na segunda dose, utilizou-se o Adjuvante Incompleto de Freund. Em doses posteriores, foi utilizada apenas a FII na mesma concentração diluída em PBS pH 7,2.

3.6- Imunizações

3.6.1- Camundongos

Camundongos Swiss foram tratados com 4.8µg/g ($\frac{1}{2}$ DL₅₀) de veneno total da *Bothrops lanceolatus* e ou PBS (pH 7.2, 0.1M), 72 horas após os animais foram imunizados com eritrócitos de carneiro (EC). Para determinação da resposta primária os soros dos animais foram colhidos após sete dias de imunizados com eritrócitos de carneiro. Como controle dois grupos foram utilizados, um com eritrócitos de carneiro e outro com veneno total (4.8µg/g). Após o fracionamento da peçonha da *Bothrops lanceolatus*, as frações também foram submetidas às mesmas etapas descritas anteriormente. Para a determinação da resposta secundária, após 60 dias os animais foram novamente submetidos ao mesmo tratamento acima descrito.

3.6.2- Coelhos

Um miligrama (1mg) da Fração II (FII) do veneno de *Bothrops lanceolatus* obtida através da cromatografia de exclusão foi diluída em PBS (0.1M, pH 7.2) e emulsificado com Adjuvante Completo de Freund (1,25mL) e inoculada em coelhos. Após duas semanas, os animais receberam a mesma

concentração da FII agora em adjuvante Incompleto de Freund (1,25mL), seguidos intervalos de duas semanas os animais foram inoculados com a mesma concentração da FII diluídos em PBS (1,25mL). As imunizações foram distribuídas em 5 aplicações de 0.25mL ao longo da região dorsal por via subcutânea. Antes da primeira dose foi colhido o soro normal destes animais e a cada imunização seguinte fazia-se coleta para sondagem do título de anticorpos reativos a peçonha da *Bothrops lanceolatus*. Após a sexta dose os animais foram sacrificados e seus soros colhidos para testes posteriores.

3.7- Determinações das concentrações protéicas

A determinação da concentração protéica foi realizada utilizando-se o método de Lowry et al., (1951) modificado segundo Hartree, (1972). Como proteína padrão utilizamos a soroalbumina bovina (BSA).

3.7.1- Determinação da concentração de eritrócitos de carneiro (EC).

Leitura da densidade óptica (D.O.) da solução de eritrócitos de carneiro a 2%, diluída 1:30 em água destilada. O leitor foi equilibrado com água destilada e a leitura realizada no espectrofotômetro ($\lambda = 550 \text{ nm}$).

3.8- Determinação dos títulos de anticorpos

3.8.1- Título de aglutininas anti-eritrócitos de carneiro (Anti-EC)

Em busca da quantificação dos anticorpos contra eritrócitos de carneiro, foi utilizada a técnica de hemaglutinação direta em microplacas (Hudson e Hay, 1989). A 25 μ L das diluições em série (razão dois) dos soros individuais em PBS pH 7.2 contendo 0,1% de gelatina, foram adicionados 25 μ L de suspensão de

eritrócitos de carneiro a 2% no mesmo diluente. A leitura da reação foi feita após 2 horas, à temperatura ambiente.

3.8.2- Título de anticorpos antiveneno

3.8.2.1- Ensaio *in vitro* imunodifusão dupla (Ouchterlony e Nisson, 1973)

Realizamos imunodifusão dupla em gel de agarose a 1% em salina (NaCl 0,15M, pH7,5). Após aquecimento foi colocado o volume de 3,5mL sobre as lâminas histológicas previamente mergulhadas em gel de agarose a 0,1%, de modo a formar uma camada de 3mm de espessura. Após o resfriamento, fez-se os orifícios de 3 mm de diâmetro para receber o antígeno (*Bothrops lanceolatus* 5µg/10µL) ou imunesoro (1/1; 1/2; 1/4; 1/8; 1/16 e 1/32) em volume de 10µL de solução. As amostras foram mantidas em câmara úmida por 18 horas. Após este período as lâminas foram lavadas, desidratadas e coradas.

3.8.2.2- Ensaio *in vitro* ELISA

Os títulos de anticorpos individuais contra o veneno de *Bothrops lanceolatus*, em coelhos e cavalos foram determinados pela técnica de reação imunoenzimática (ELISA) indireta (Engvall, 1980). Microplacas de 96 cavidades (Corning®) foram sensibilizadas com veneno de *Bothrops lanceolatus* ou *Bothrops jararaca* diluídos em tampão carbonata-bicarbonato 0,1M pH 9.6 na concentração de 10µg/mL de veneno, sendo colocado em cada cavidade 100µL de solução e incubados durante uma noite a 4°C. Os sítios livres foram bloqueados por 2 horas a temperatura ambiente com 200µL de uma solução de soro fetal bovino (SFB) a 10% diluído em tampão PBS pH 7.2. Após a adição de 100µL das diluições em série (razão 2) dos soros de cavalo e coelho foram incubados a 37° por 2 horas. Foram empregados

anticorpos de coelho anti-IgG de cavalo conjugado a peroxidase (Sigma Chemical CO[®]) e ou anticorpos de burro anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech[®]). Como substrato, utilizaram-se Ophenylenediamine (Sigma Chemical CO[®]) e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 15 minutos, pela adição de ácido sulfúrico a 2,5N e a densidade óptica foi medida, usando-se um leitor de ELISA com filtro de 492nm. Os títulos foram obtidos através do processamento das densidades ópticas *versus* o inverso do logaritmo da diluição das proteínas séricas. A reação foi definida como positiva até a densidade óptica de 0,005 (Rodriguez-Acosta, et al.,1998).

3.8.2.3- Ensaio *in vivo* atividade hemorrágica (Kondo et al., 1960; Theakston e Keid, 1983)

A atividade Hemorrágica foi determinada pelo método de Kondo et al., (1960) e Theakston e Keid, (1983) com algumas modificações. Camundongos Swiss machos de 18 a 22g aproximadamente, foram inoculados com 0,1mL por via intradérmica na região dorsal com diferentes concentrações da peçonha de *Bothrops lanceolatus* obedecendo à diluição de 1.6 entre doses (1.0, 1.6, 2.6, 4.1, 6.5, 10.0, 16.0 e 25.6 µg/0,1mL).

Após seis horas estes animais foram sacrificados, as peles removidas e observada a presença de área hemorrágica na face interna. Os animais controle foram injetados com igual volume de salina. A determinação de dose mínima hemorrágica (DMH) corresponde a menor quantidade de veneno capaz de causar um halo hemorrágico médio de 5.0 mm de diâmetro.

3.8.2.4- Ensaio *in vivo* neutralização da atividade hemorrágica.

Após determinar a dose mínima hemorrágica (DMH), os imunesoros comercial (Anti-BL) e o obtido em esquemas de imunização em coelhos (Anti-FII), foram testados quanto a sua capacidade em neutralizar esta atividade.

O volume de 50µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (4.1, 6.5, 10.0 e 16.0 µg), foram incubados com 50µL dos imunesoros e ou salina por uma hora a 30°C. Após a incubação foi obedecido o protocolo acima descrito para a atividade hemorrágica.

Foi determinado como neutralização da atividade hemorrágica o imunesoro que diminuísse o halo hemorrágico causado pelo veneno da *Bothrops lanceolatus*.

3.8.2.5- Ensaio *in vitro* atividade hemolítica indireta

O efeito hemolítico da peçonha da *Bothrops lanceolatus* foi estimado utilizando-se hemácias de carneiro lavadas, e suplementadas com gema de ovo conforme descrito por Gutiérrez et al., (1984). As hemácias de carneiro foram lavadas por três vezes com salina tamponada PBS, para garantir a eliminação de todo e qualquer fator sorológico, ao qual o veneno pudesse exercer alguma ação biológica. Após a lavagem as hemácias foram suspensas a 2,5% no mesmo tampão.

Para este ensaio, utilizaram-se 50µL de uma suspensão de gema de ovo (1 gema de ovo em 100 mL de PBS) que foram adicionados a 600µL da solução de hemácias lavadas e por final foram adicionados 50µL das amostras da peçonha (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 e 1800 µg/mL), sendo o volume final ajustado para 3mL. As concentrações finais da peçonha após a mistura completa com as soluções correspondiam a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 µg por 3mL. Após 30 minutos de incubação, a 37°C em Banho-Maria, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 600 x g. Em seguida, utilizaram-se microplacas de 96 cavidades (Corning®) para determinar através do leitor de ELISA a absorbância a 540nm. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

As amostras foram comparadas ao controle negativo (incubado sem o veneno) e ao hemolizado (constituído por água destilada no lugar do tampão). A atividade hemolítica foi expressa em valores relativos (%).

3.8.2.6- Ensaio *in vitro* neutralização da atividade hemolítica indireta

Para determinar a neutralização da atividade Hemolítica Indireta, os imunesoros comercial (Anti-BL) e o obtido em esquemas de imunização em coelhos (Anti-FII), foram testados.

O volume de 25µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (1600, 2000, 2400 e 2800 µg/mL), foram incubados com 25µL dos imunesoros e ou salina por uma hora a 30°C. Após a incubação foi obedecido o protocolo acima descrito para a atividade hemolítica indireta.

Foi determinado como neutralização da atividade hemolítica o imunesoro que diminuísse a hemólise causada pelo veneno da *Bothrops lanceolatus*.

3.8.2.7- Ensaio *in vitro* atividade proteolítica sobre a caseína 1%

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se a caseína como substrato, segundo o método de Kunitz, (1947) modificado por Mandelbaum et al., (1982). A solução de caseína foi preparada no momento do uso, dissolvendo-se 1g de caseína em 50mL de tampão Tris-HCl 0,2M pH 8.8. Após 20 minutos de aquecimento, a solução foi filtrada e o volume completado para 50mL com água destilada, resultando numa solução de caseína a 1%.

A solução de ensaio continha 1,9mL de caseína 1%, 0,1mL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* em várias concentrações (40, 60, 80, 100 µg). A reação ocorreu durante 20 minutos de incubação a 37°C em Banho-Maria. A reação foi

interrompida com 2,0mL de ácido tricloroacético a 5% (TCA). Os tubos foram deixados 30 minutos em banho de gelo. Em seguida cada amostra foi centrifugada a 2500 x g por 15 minutos e o sobrenadante submetido à leitura no espectrofotômetro / UV a 280nm utilizando-se cubetas de sílica de quartzo.

O aumento da absorbância é proporcional à atividade enzimática. Os testes foram realizados em triplicata.

3.8.2.8- Ensaio *in vitro* neutralização da atividade proteolítica sobre a caseína1%

Para determinar a neutralização da atividade proteolítica sobre a caseína, os imunesoros comercial (Anti-BL) e o obtido em esquemas de imunização em coelhos (Anti-FII) foram testados.

O volume de 50µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (40, 60, 80, 100 µg), foi incubado com 50µL dos imunesoros e ou salina por uma hora a 30°C. Após a incubação, foi obedecido o protocolo acima descrito para a atividade proteolítica sobre a caseína a 1%.

Foi determinado como neutralização da atividade proteolítica o imunesoro que diminuísse a proteólise causada pelo veneno da *Bothrops lanceolatus*.

3.8.2.9- Ensaio *in vitro* atividade esterásica sobre o TAME

A atividade esterásica foi avaliada, como descrito por Hummel (1959) com algumas modificações (Viljocn et al., 1979; Schewert e Takenaka, 1995). O ensaio da atividade esterásica da peçonha da *Bothrops lanceolatus* foi iniciado com a adição de 0,1mL das soluções da peçonha (40, 60, 80 e 100 µg) em 1,4 mL de tampão Tris HCl 0.1M pH 7.8, e 1,5mL de substrato TAME (p-toluene-sulfonyl-

L-arginine methyl ésterhydrochloride) solubilizado na concentração de 0.001M em tampão Tris 0.05M em pH. 7.5, incubados no espectrofotômetro em cubeta de sílica de quartzo. A variação da absorbância foi observada a 247nm / UV durante 10 minutos de hidrólise com leituras periódicas a cada 30segundos. O branco da reação foi utilizado apenas o tampão.

3.8.2.10- Ensaio *in vitro* neutralização da atividade esterásica sobre o TAME

Para determinar a neutralização da atividade esterásica sobre a TAME, os imunesoros comercial (Anti-BL) e o obtido em esquemas de imunização em coelhos (Anti-FII) foram testados.

O volume de 50µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (40, 60, 80, 100 µg), foi incubado com 50µL dos imunesoros e ou salina por uma hora a 30°C. Após a incubação, foi obedecido o protocolo acima descrito para a atividade esterásica sobre o TAME.

Foi determinado como neutralização da atividade esterásica, o imunesoro que diminuísse a atividade enzimática (através da redução dos valores de leituras) causada pelo veneno da *Bothrops lanceolatus*.

3.8.2.11- Ensaio *in vitro* atividade coagulante sobre o fibrinogênio

A atividade tipo trombina foi determinada medindo-se a coagulação em uma solução 2mg de fibrinogênio humano (KABI SUÉCIA) dissolvido em 1mL de PBS pH 7.4 a 0,05M.

Utilizaram-se microplacas de 96 cavidades (Corning®) adicionando 30µL do veneno total em diferentes concentrações (0, 20, 30, 40 e 50 µg), juntamente com uma solução de 20µL de tampão Tris 0.1M pH. 7,4 e ao final foi

acrescido de 150µL de fibrinogênio humano. O branco da reação recebeu 150µL de fibrinogênio humano e 50 µL de tampão Tris 0.1M pH. 7,4. A reação ocorreu a 37°C e a leitura foi realizada a 340nm em intervalos de 30 segundos durante 10 minutos através do leitor de ELISA. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

O tempo de formação de coágulo foi determinado pelo aumento da turbidez apresentada pela formação da rede de fibrina a 340nm.

3.8.2.12- Ensaio *in vitro* neutralização da atividade coagulante sobre o fibrinogênio

Para determinar a neutralização da atividade coagulante sobre o fibrinogênio, os imunesoros comercial (Anti-BL) e o obtido em esquemas de imunização em coelhos (Anti-FII) foram testados.

O volume de 15µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (0, 20, 30, 40 e 50 µg), foi incubado com 15µL dos imunesoros e ou salina por uma hora a 30°C. Após a incubação, foi obedecido o protocolo acima descrito para a atividade coagulante sobre o fibrinogênio.

Foi determinado como neutralização da atividade coagulante sobre o fibrinogênio o imunesoro que prolongasse o tempo de coagulação (aumento de turbidez), quando comparado ao causado pelo veneno da *Bothrops lanceolatus*.

3.9- Análise estatística

Os resultados foram apresentados pela média ± erro padrão da média (EPM). As significâncias das diferenças entre grupo e tratamento foram avaliadas utilizando-se a distribuição de *Student* e entre os vários grupos e tratamentos utilizaram-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de TUKEY - KRAMER para múltiplas comparações. Foi considerado significativo quando $P \leq 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Efeito da peçonha da *Bothrops lanceolatus* sobre a resposta primária e secundária a eritrócitos de carneiro em camundongos

Protocolo (1057-2) aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA - COBEA.

Em camundongos, a resposta primária a antígenos não relacionados, foi obtida através da ação da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) sobre a produção de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (anti-EC), usando-se os soros coletados 7 dias após a imunização com eritrócitos de carneiro e titulando-os em ensaio de hemaglutinação (Hudson e Hay, 1989).

A dose letal da peçonha da *Bothrops lanceolatus* ($1 DL_{50} = 9.6\text{mg/Kg}$) utilizada no tratamento de camundongos foi obtida segundo Lôbo de Araújo (1990), de acordo com o método de Weil (1952).

O título hemaglutinante de anticorpos Anti-EC na resposta primária foi significativamente reduzido nos animais tratados com $4.8\mu\text{g/g}$ ($1/2 DL_{50}$) do veneno da *Bothrops lanceolatus* e 72 horas após imunizados com eritrócitos de carneiro ($P < 0,05$). Os animais tratados apenas com o veneno total ($4.8\mu\text{g/g}$) não produziram anticorpos Anti-EC ($P > 0,05$), quando comparados aos animais tratados com tampão (PBS) e após 72 horas imunizados com eritrócitos de carneiro (Figura 2).

Passados sessenta dias, os animais foram novamente tratados com o veneno da *Bothrops lanceolatus* $4.8\mu\text{g/g}$ ($1/2 DL_{50}$) e após 72 horas imunizados com eritrócitos de carneiro como descrito no protocolo anterior, então foi determinada a resposta secundária.

Ao exemplo do que ocorreu anteriormente, o título hemaglutinante de anticorpos Anti-EC na resposta secundária foi reduzido significativamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo tratado com PBS e imunizado 72 horas após com eritrócitos de carneiro, conforme demonstrado na Figura 3. O grupo que recebeu apenas veneno total não obteve título de anticorpos Anti-EC ($P < 0,05$).

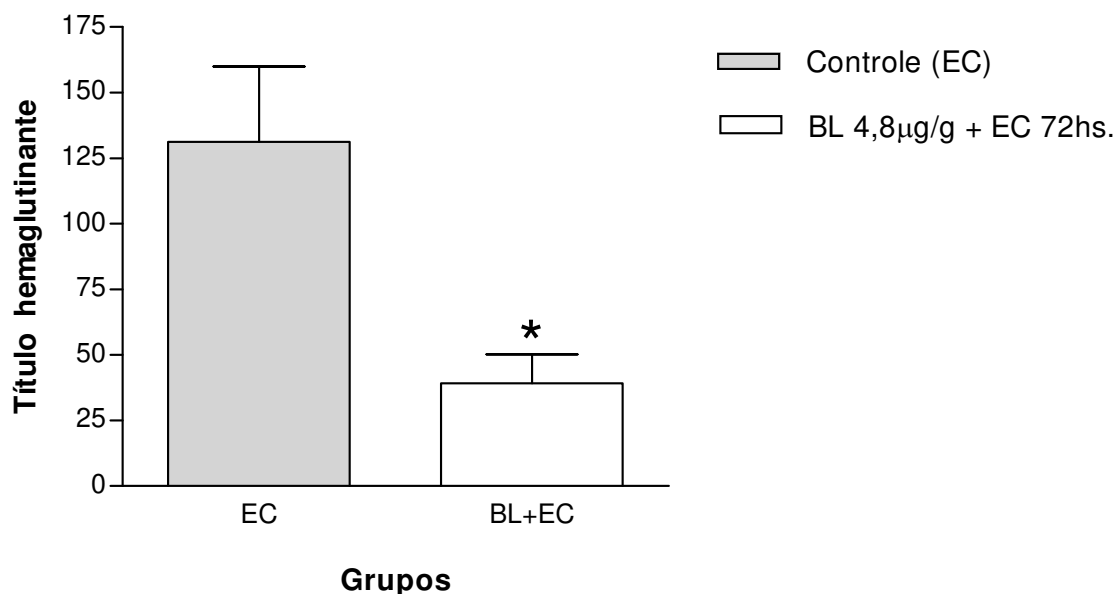


Figura 2- Efeito da peçonha de *Bothrops lanceolatus* sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Primária.

Teste de Hemaglutinação realizado com o soro de camundongos Swiss, os quais receberam tratamento com a peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) ($4,8\mu\text{g/g} = 1/2 DL_{50}$) e 72 horas depois foram imunizados com Eritrócitos de Carneiro (EC a 2%). O grupo controle foi imunizado com eritrócitos de carneiro (EC a 2%). Um outro grupo recebeu apenas PBS 0,1M pH 7.2. Sete dias após imunização, foram colhidos os soros e realizados os testes. Média \pm E.P.M. (n=6). Teste *t Student*.

* $P < 0,05$ significante diferente do controle.

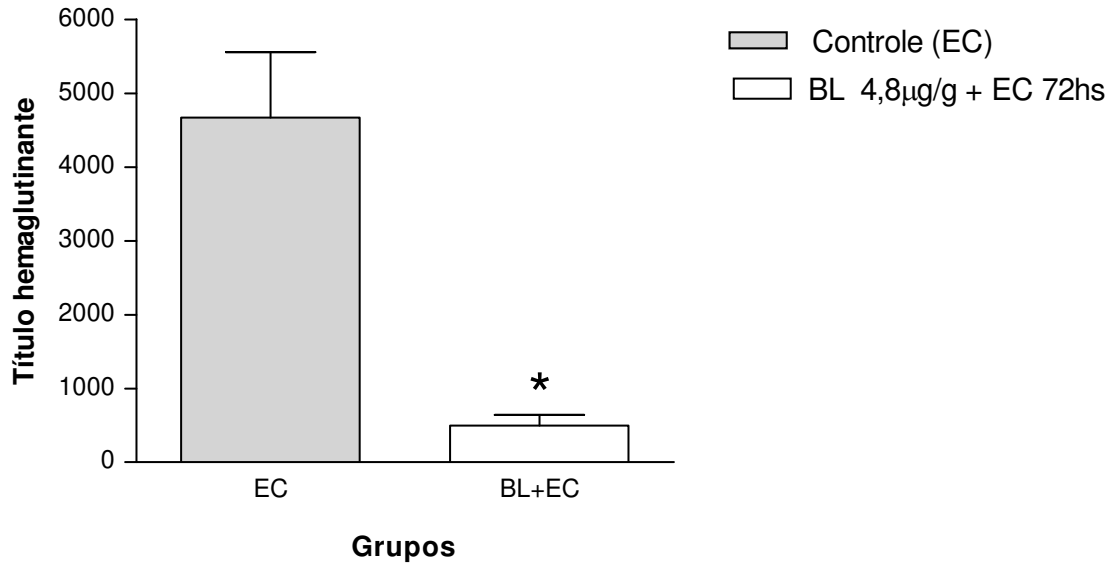


Figura 3- Efeito da Peçonha da *Bothrops lanceolatus* sobre a Produção de Anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Secundária.

Teste de Hemaglutinação realizado com o soro de camundongos Swiss, os quais receberam pela segunda vez o tratamento com a Peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) (4,8µg/g = 1/2 DL_{50}) e novamente após 72 horas foram imunizados com Eritrócitos de Carneiro (EC a 2%). O grupo controle foi novamente imunizado com eritrócitos de carneiro (EC a 2%). Um outro grupo recebeu apenas PBS 0,1M pH 7.2. Sete dias após imunização, foram colhidos os soros e realizados os testes. Média ± E.P.M. (n=6). Teste *t Student*.

* $P < 0,05$ significante diferente do controle.

4.2- Fracionamento da peçonha da *Bothrops lanceolatus* em sephadex G-100

Após ser demonstrado que o veneno da *Bothrops lanceolatus* reduz a resposta imune humoral de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro, o veneno foi fracionado em coluna de Sephadex G-100, na tentativa de identificar a fração responsável por esta atividade. Para isto 200mg de veneno foram aplicados à coluna de Sephadex G-100, resultando em três frações, que foram determinadas quanto as suas atividades (Figura 4).

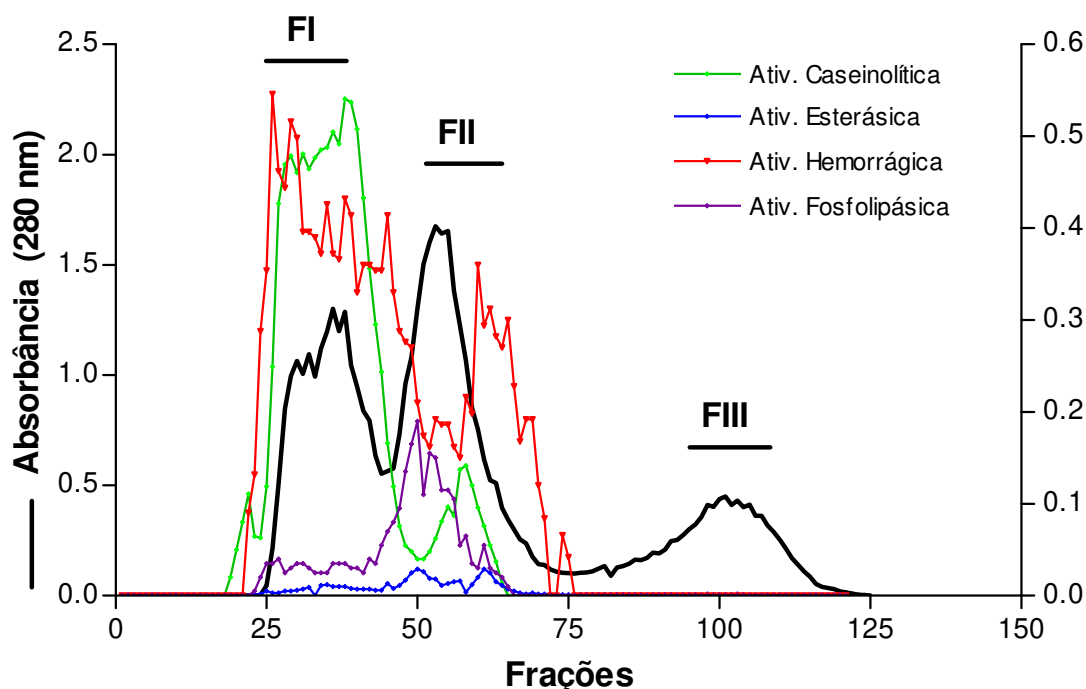


Figura 4- Cromatografia em Sephadex G-100.

Peçonha da *Bothrops lanceolatus* (200mg) foi aplicada à coluna (1,2 x 75 cm) de Sephadex G-100, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl, 50mM, pH 7,5. Amostras de 1,5mL foram coletadas a 4°C, utilizando-se fluxo de 5mL/h, a concentração protéica das amostras foram estimadas pela leitura a 280nm em espectrofotômetro.

4.3- Efeito das frações da peçonha da *Bothrops lanceolatus* sobre a resposta primária e secundária a eritrócitos de carneiro, em camundongos

Depois de obtidas as frações por cromatografia, foram inoculadas em camundongos Swiss, para a verificação de qual delas seria responsável pela redução da resposta imune humoral aos eritrócitos de carneiro, como demonstrado pelo veneno total. O título de anticorpos Anti-EC foi quantificado através do ensaio de hemaglutinação.

A Figura 5 demonstra os resultados dos títulos hemaglutinantes obtidos e o efeito da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e suas frações (BL = $4.8\mu\text{g/g}$, $P<0,05$; FI = $2.4\mu\text{g/g}$, $P<0,05$; FII = $2.4\mu\text{g/g}$, $P>0,05$). Como podemos observar apenas a fração I (FI) foi capaz de reduzir significativamente a resposta imune humoral já demonstrado para o veneno total.

A resposta secundária (Figura 6) também foi analisada com o propósito de observar se os resultados obtidos na resposta primária se mantinham. Como esperado a fração I (FI) se mostrou novamente com significativa atividade inibitória sobre a resposta imune humoral de camundongos Swiss imunizados com eritrócitos de carneiro ($2.4\mu\text{g/g}$, $P<0,05$), a exemplo do que ocorreu com o veneno total da *Bothrops lanceolatus* ($4.8\mu\text{g/g}$, $P<0,05$). A fração II (FII) ($2.4\mu\text{g/g}$, $P>0,05$) não mostrou significativa redução quando comparada aos animais imunizados apenas com eritrócitos de carneiro, porém a redução foi significativa quando comparada aos animais que foram tratados com o veneno total e ou a FI ($P<0,05$).

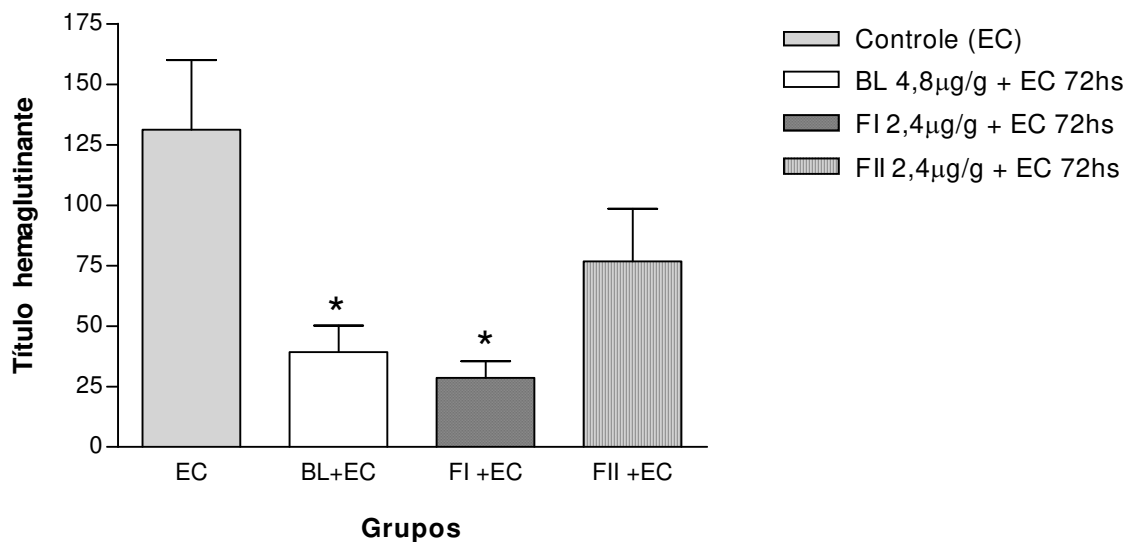


Figura 5- Efeito da peçonha de *Bothrops lanceolatus* e de suas frações sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Primária.

Teste de hemaglutinação realizado com o soro de camundongos Swiss, os quais receberam o tratamento com a peçonha da *Bothrops lanceolatus* (4,8µg/g = 1/2 DL_{50}) ou as frações (2,4µg/g) da mesma e após 72 horas foram imunizados com Eritrócitos de Carneiro (EC a 2%). O grupo controle foi imunizado com eritrócitos de carneiro (EC a 2%). Um outro grupo recebeu apenas PBS 0,1M pH 7.2. Sete dias após imunização, foram colhidos os soros e realizados os testes. Média ± E.P.M. (n=6). Teste ANOVA e Tukey, no pós-teste.

* $P < 0,05$ significativa diferente do controle.

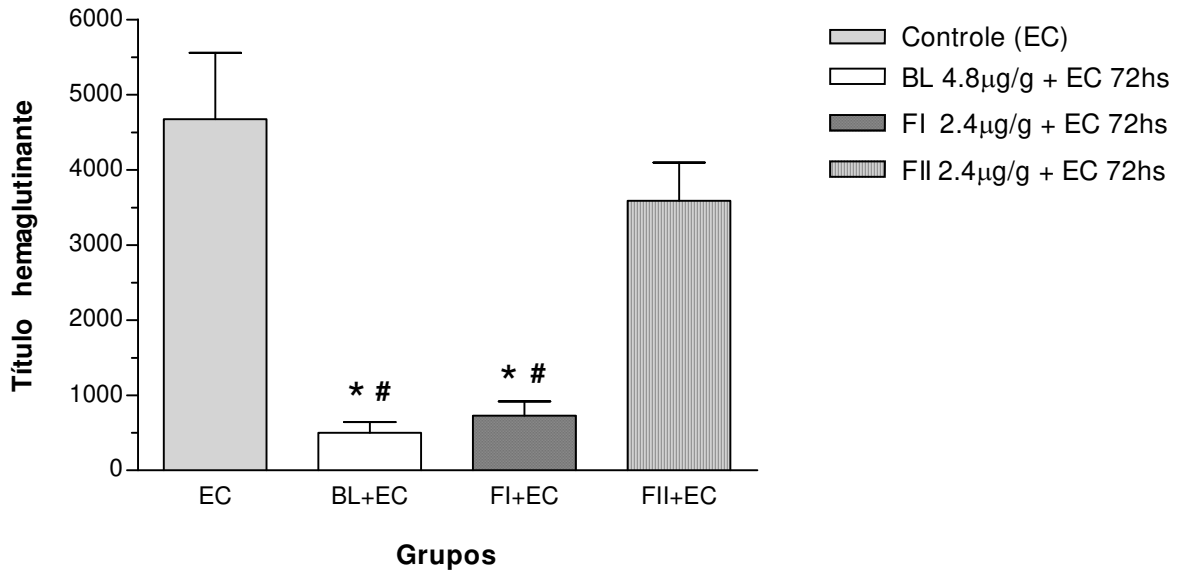


Figura 6- Efeito da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e das suas frações sobre a produção de anticorpos ao EC em camundongos na Resposta Secundária.

Teste de hemaglutinação realizado com o soro de camundongos Swiss, os quais receberam pela segunda vez o tratamento com a peçonha da *Bothrops lanceolatus* (2,4µg/g = 1/2 DL_{50}) ou suas frações (2,4µg/g) e novamente após 72 horas foram imunizados com Eritrócitos de Carneiro (EC a 2%). O grupo controle foi novamente imunizado com eritrócitos de carneiro (EC a 2%). Um outro grupo recebeu apenas PBS 0,1M pH 7.2. Sete dias após imunização, foram colhidos os soros e realizados os testes. Média ± E.P.M. (n=6). Teste ANOVA e Tukey, no pós-teste.

* $P < 0,05$ significante diferente do controle.

$P < 0,05$ significante diferente do tratado com a FII.

4.4- Imunização de coelhos para a produção de imunesoro

Protocolo (1218-1) aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA - COBEA.

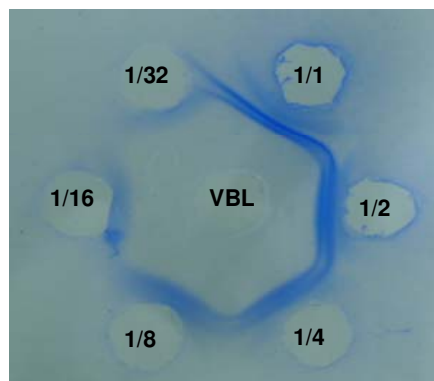
Após conhecer a atividade inibitória do veneno da *Bothrops lanceolatus* sobre a resposta imune humoral em camundongos, podemos prever qual a atividade deste veneno sobre o sistema imune dos animais que são utilizados para a produção de soro antiveneno. Separamos o veneno em frações e identificamos a fração I (FI) como a que concentrou a maior atividade inibitória sobre a resposta imune humoral. De posse destas informações, a fração II (FII) foi utilizada para imunizar animais (coelhos), com o objetivo de se tentar produzir um imunesoro com maior eficácia na neutralização das atividades da peçonha da *Bothrops lanceolatus*.

Os coelhos foram imunizados com 1mg da Fração II (FII) em adjuvante completo de Freund, seguido de mais seis doses, na qual a segunda dose de antígeno (FII) utilizou adjuvante incompleto de Freund. As demais doses, o antígeno (FII) foi diluído apenas em tampão PBS (Oliveira Lima e Dias da Silva, 1970).

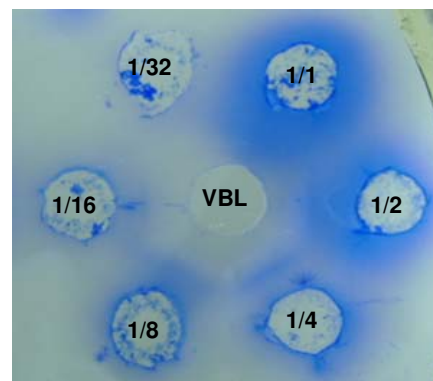
A sondagem dos títulos de anticorpos nestes animais foi realizada com coletas de soros antes e após as imunizações com a FII através do teste de imunodifusão, que demonstraram nos soros de animais imunizados com a FII (Anti-FII) linhas de precipitação mais evidentes que aquelas obtidas com o soro comercial (Anti-BL) produzidos em eqüinos, que foram imunizados com a peçonha total da *Bothrops lanceolatus* (Ouchterlony e Nisson, 1973) (Figura 7).

Com o intuito de quantificar a concentração de anticorpos reativos nos imunesoros Anti-BL e Anti-FII, foi realizado o teste imunoenzimático ELISA (Engvall, 1980; Rodriguez-Acosta et al., 1998), que confirmou os resultados obtidos em imunodifusão (Figura 8).

Com o intuito de verificar a reatividade dos imunesoros específicos (Anti-BL e Anti-FII) para a peçonha da *Bothrops lanceolatus*, realizamos testes de imunodifusão e ELISA utilizando a peçonha da *Bothrops jararaca* e verificamos reação cruzada, confirmando assim, as semelhanças filogenéticas entre as espécies de mesmo gênero (Figura 9). A reação cruzada de antivenenos específicos a antígenos de peçonhas de mesmo gênero e ou espécies diferentes é relatada por diversos pesquisadores (Lamb e Hanna, 1904; Oudin, 1952; Engvall e Perlmann, 1972; Dias da Silva et al., 1989).



Centro: BL (2.5µg/10µL peçonha)
Diluições: Imunesoros de Coelhos
 Anti-FII da BL



Centro: BL (2.5µg/10µL peçonha)
Diluições: Imunesoro comercial
 Anti-BL, BO 278

Figura 7- Imunodifusão Radial (precipitação com os imunesoros)

Reação de precipitação em gel de agarose 1% sobre lâminas histológicas. Amostras de 10µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (2,5µg) foram adicionadas no orifício central e diluições seriadas dos imunesoros (10µL) foram colocadas nas bordas. Após a reação ocorrer, as amostras foram lavadas em salina, desidratadas, coradas e as precipitações identificadas.

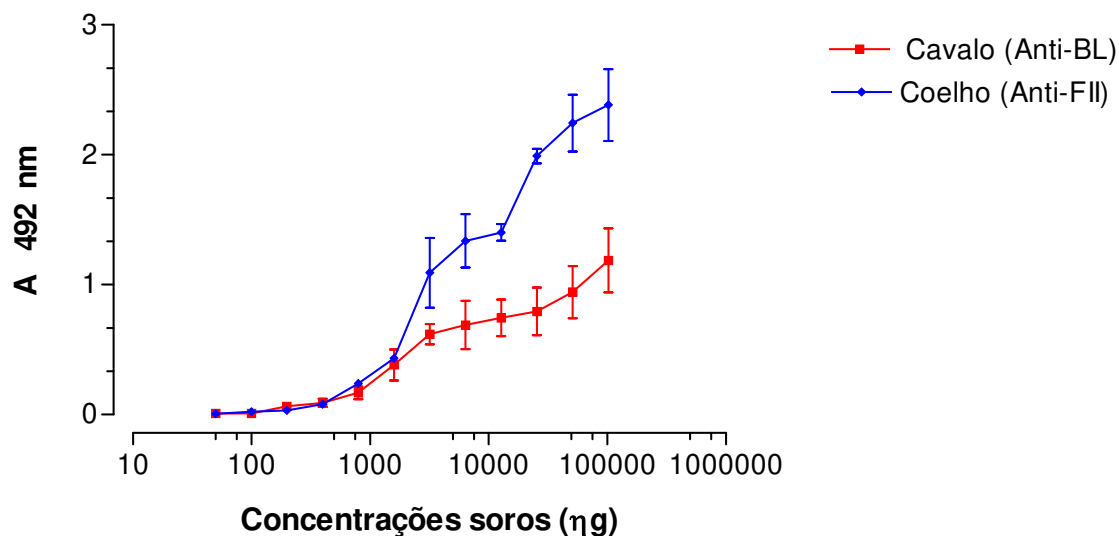


Figura 8- Curva de titulação das concentrações dos soros hiperimunes frente ao antígeno da peçonha da *Bothrops lanceolatus* em teste imunoenzimático (ELISA).

Comparação da reatividade de dois antivenenos: o Anti-BL (produzido em equínos utilizando a peçonha integral da *Bothrops lanceolatus*) e o Anti-FII (produzidos em coelhos utilizando a FII obtida através de cromatografia da peçonha da *Bothrops lanceolatus*). O soro normal de ambas as espécies foi utilizado como controle. Placas sensibilizadas com o antígeno da *Bothrops lanceolatus* (10µg/mL). Média ± E.P.M. (n = 4; triplicata).

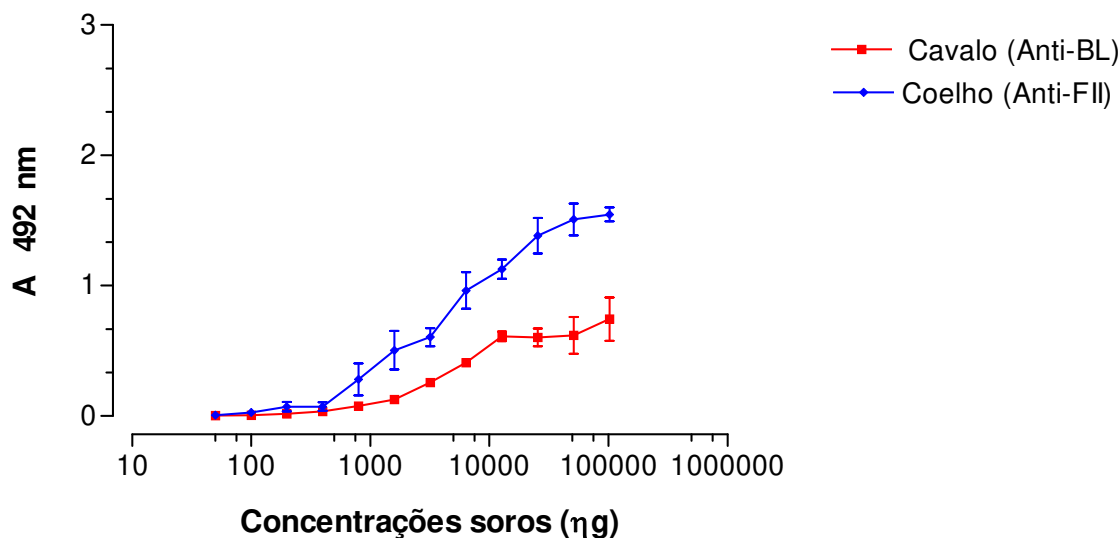


Figura 9- Curva de titulação das concentrações dos soros hiperimunes frente ao antígeno da peçonha da *Bothrops jararaca* (reatividade cruzada) em teste imunoenzimático (ELISA).

Comparação da reatividade cruzada de dois antivenenos: o Anti-BL (produzido em equínos utilizando a peçonha integral da *Bothrops lanceolatus*) e o Anti-FII (produzidos em coelhos utilizando a FII obtida através de cromatografia da peçonha da *Bothrops lanceolatus*). O soro normal de ambas as espécies foi utilizado como controle. Placas sensibilizadas com o antígeno da *Bothrops jararaca* (10µg/mL). Média ± E.P.M. (n = 4; triplicata).

4.5- Atividades biológicas do veneno da *Bothrops lanceolatus* e sua neutralização com imunesoros específicos

Após estudo *in vitro*, analisando a reatividade dos imunesoros produzidos em eqüinos (Anti-BL) e em coelhos (Anti-FII), através dos testes de imunodifusão e ELISA, foi constatada maior reatividade para o imunesoro Anti-FII, contra a peçonha da *Bothrops lanceolatus*. Após este resultado, algumas atividades biológicas foram realizadas e a capacidade de neutralização dos antivenenos analisada.

Como demonstrado por Vital Brazil (1914), que propôs fixar a dose de imunesoro e variar a concentração da peçonha, verificando a neutralização da mistura após incubação prévia, pois de modo contrário ocorriam variações muito grandes e com resultados às vezes contraditórios e inadmissíveis (Brazil, 1911). Foi fixada, portanto o volume dos imunesoros (Anti-BL e Anti-FII) e variadas as concentrações da peçonha (Oliveira Lima e Dias da Silva, 1970).

4.5.1- Atividade hemorrágica (Kondo et al., 1960; Theakston e Keid, 1983)

A atividade hemorrágica é uma das características das peçonhas botrópicas, esta também é muito evidente nos envenenamentos pela *Bothrops lanceolatus*. Esta atividade ocorreu de modo crescente mostrando-se proporcional ao aumento da concentração da peçonha (Figura. 10). Como podemos observar, a dose mínima hemorrágica (DMH) foi de 1.6µg/0,1mL (n = 8). Este resultado concorda com o obtido anteriormente por Lôbo de Araújo et al., (1990; 1994; 1998).

A neutralização da atividade hemorrágica foi realizada mediante incubação prévia por uma hora da peçonha de *Bothrops lanceolatus* com os imunesoros (Anti-BL ou Anti-FII) e constatada mediante a redução do halo hemorrágico comparado ao observado pela peçonha (controle). A neutralização desta atividade foi proporcionada por ambos os imunesoros, porém com o Anti-BL ocorreu de modo mais significativo com todas as doses ($P < 0,05$), já o Anti-FII apenas com a dose de 4.0µg ($P < 0,05$) (Figura 11).

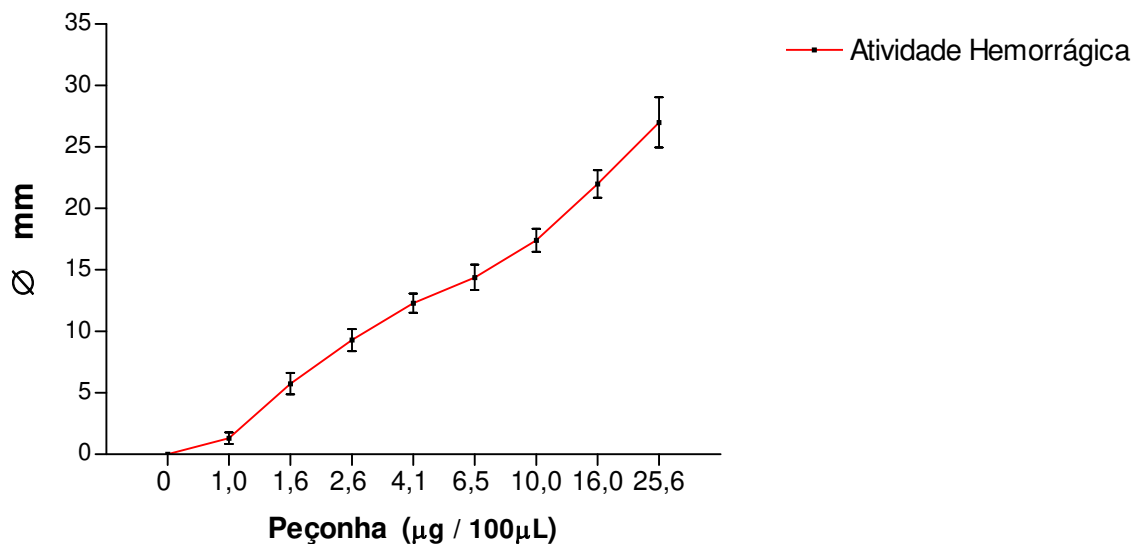


Figura 10- Efeito das concentrações da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) na formação do halo hemorrágico em camundongos.

Camundongos Swiss machos (18 a 22g) foram inoculados com 0,1mL, por via intradérmica na região dorsal (4 pontos) com diferentes concentrações da peçonha de *Bothrops lanceolatus* (0, 1.0, 1.6, 2.6, 4.0, 6.5, 10.0, 16.0 e 25.6µg). O controle recebeu apenas tampão (PBS). Após 6 horas, os animais foram sacrificados e os halos hemorrágicos medidos. Cada ponto representa a Média ± E.P.M. (n=8).

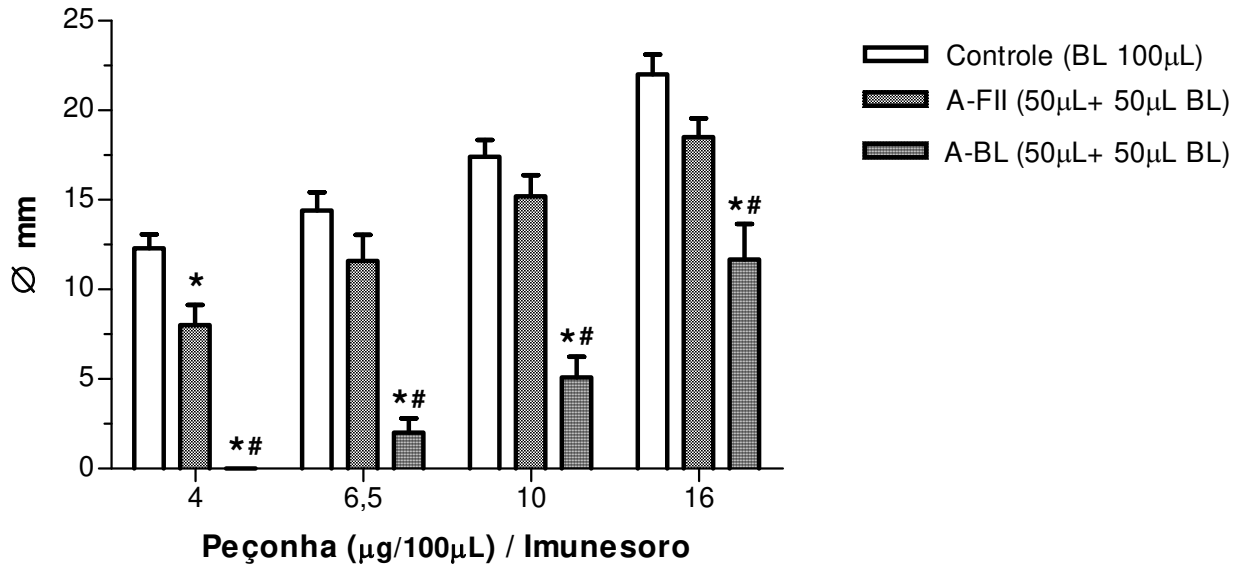


Figura 11- Comparação dos imunesoros específicos em neutralizar a atividade hemorrágica da peçonha da *Bothrops lanceolatus*.

O volume de 50µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) em diversas doses (4.0, 6.5, 10.0 e 16.0µg), nas quais foram acrescentadas com 50µL de tampão (controle) ou imunesoros e incubadas por 1 hora a 30°C. Destas soluções, 100µL foram inoculados em quatro pontos no dorso dos camundongos e após 6 horas os halos hemorrágicos foram medidos. Média ± E.P.M. (n = 8). (ANOVA e Tukey no pós-teste)

* $P < 0,05$ diferenças significante entre a peçonha da BL e os imunesoros.

$P < 0,05$ diferenças significante entre os imunesoros.

4.5.2- Atividade hemolítica indireta (Gutiérrez et al., 1984)

A atividade hemolítica indireta da peçonha da *Bothrops lanceolatus* ocorreu de modo crescente e atingiu um platô a partir da concentração de 70µg/3mL, com hemólise relativa de 85% (Figura 12).

A neutralização da atividade hemolítica indireta foi realizada mediante incubação prévia por uma hora da peçonha com os imunesoros (Anti-BL ou Anti-FII) e constatada mediante a redução da hemólise comparada ao observado pela peçonha (controle). A neutralização desta atividade foi proporcionada por ambos os imunesoros, porém com o Anti-FII ocorreu de modo significativo em todas as concentrações ($P < 0,05$) e com o Anti-BL somente nas concentrações de 40 e 50µg/3mL ($P < 0,05$) (Figura. 13).

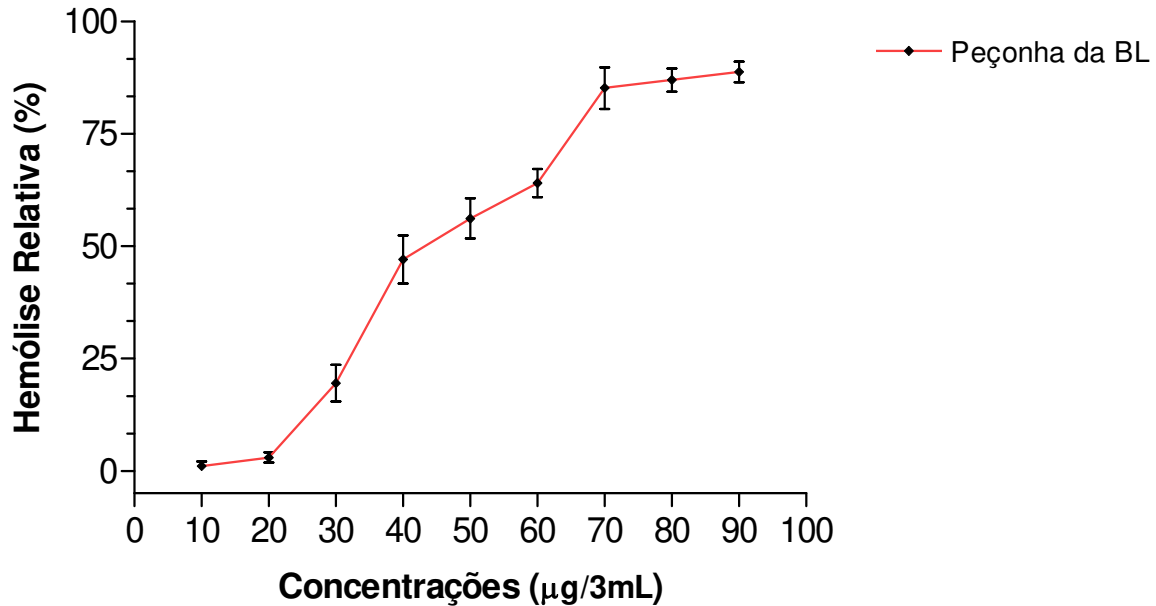


Figura 12- Influência de diferentes concentrações da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) sobre a hemólise de eritrócitos de carneiro (2,5%) suspensos em PBS contendo gema de ovo.

O volume de 50µL de várias concentrações da peçonha da BL (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 e 1800µg/mL), foi acrescido de 50µL de solução contendo gema de ovo (1:100 em PBS) e 600µL de suspensão de eritrócitos de carneiro a 2,5%, com o volume final ajustado para 3mL com tampão. As concentrações finais corresponderam a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90µg em 3mL. Como controle foi utilizado tampão PBS. Para fins comparativos, foi utilizada água destilada em lugar de tampão que correspondeu a 100% de hemólise. Cada ponto representa à média ± E.P.M. (n = 5).

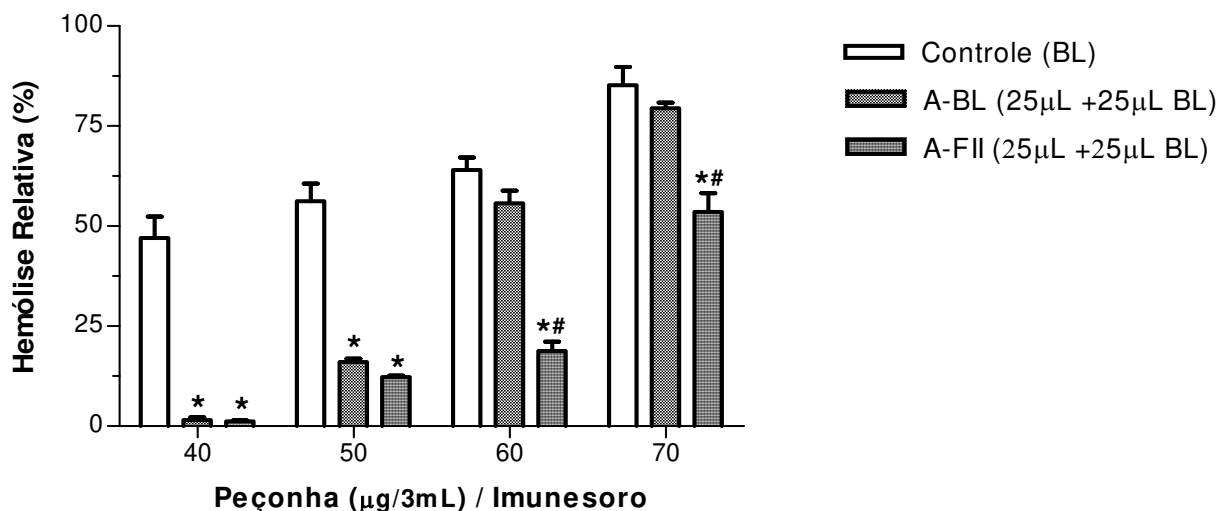


Figura 13- Comparação dos imunesoros em neutralizar a atividade hemolítica da peçonha da *Bothrops lanceolatus* sobre eritrócitos de carneiro (2,5%) suspensos em PBS contendo gema de ovo.

A neutralização da atividade hemolítica pelos soros foi observada após incubação prévia por 1 hora a 30°C de 25µL dos imunesoros com o mesmo volume da peçonha (40, 50, 60 e 70 µg) que após foram acrescidos a 50µL de solução contendo gema de ovo (1:100 em PBS) e 600µL de suspensão de eritrócitos de carneiro a 2,5%, com o volume final ajustado para 3mL com tampão PBS 0.1M pH 7.2. Como controle, foram utilizados tampão PBS e água destilada (100% de hemólise). Cada ponto representa à média ± E.P.M. (n = 5). (ANOVA e Tukey no pós-teste).

* $P < 0,05$ diferenças significante entre a peçonha da BL e os imunesoros.

$P < 0,05$ diferenças significante entre os imunesoros.

4.5.3- Atividade caseinolítica (Kunitz et al., 1947)

A atividade proteolítica (caseína1%), exercida pelo veneno da *Bothrops lanceolatus* ocorreu de modo crescente (Figura 14).

A neutralização da atividade caseinolítica foi realizada mediante incubação prévia por uma hora da peçonha com os imunesoros (Anti-BL ou Anti-FII) e constatada mediante a redução da hidrólise enzimática comparada ao observado pela peçonha (controle). A neutralização desta atividade foi proporcionada por ambos os imunesoros, em todas as concentrações de modo significante ($P < 0,05$), porém de forma mais evidente pelo Anti-FII, (Figura. 14).

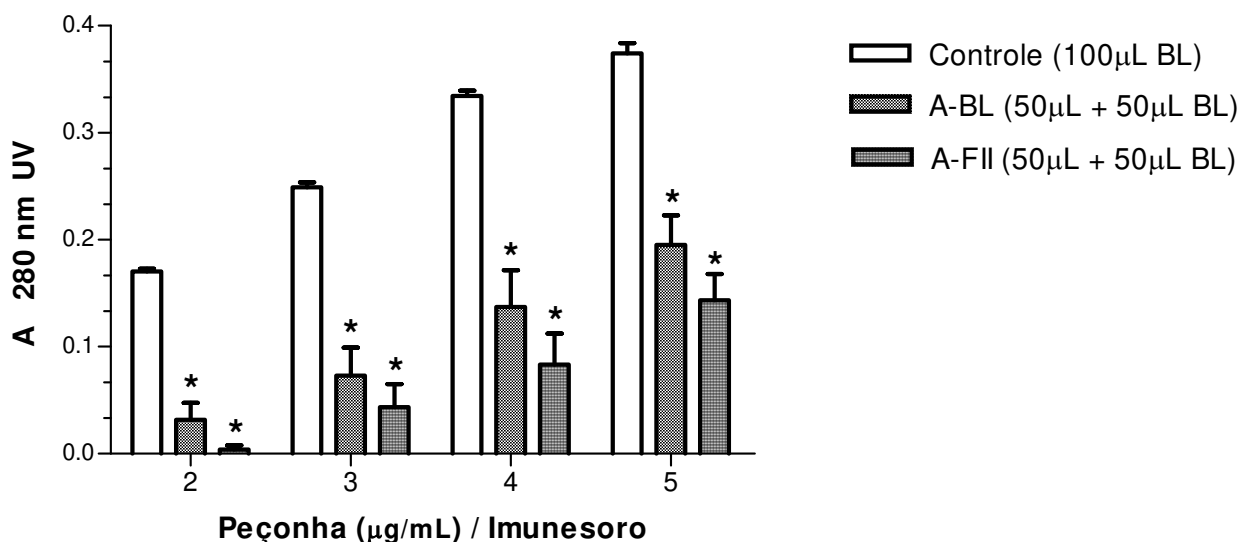


Figura 14- Atividade proteolítica da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) sobre a caseína 1% e sua neutralização com imunesoros.

A atividade caseinolítica foi determinada utilizando-se 100µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (40, 60, 80 e 100µg), adicionada a 1.9mL de caseína (1%), correspondendo ao final a 2, 3, 4 e 5µg/mL. A neutralização da atividade caseinolítica foi obtida após incubação prévia por 1 hora a 30°C de 50µL dos imunesoros com o mesmo volume da peçonha (40, 60, 80 e 100µg), em seguida foi adicionada a solução de caseína. Utilizou-se o tampão Tris HCl 0.1M pH 7.8 como branco da reação. Média ± E.P.M (n = 6, triplicata). (ANOVA e Tukey).

* $P < 0,05$ diferenças significante entre a peçonha da BL e os imunesoros.

4.5.4- Atividade tase esterásica (Hummel, 1959; com modificações Viljoc et al., 1979 e Schewert e Takenaka, 1995).

A cinética da atividade esterásica do veneno da *Bothrops lanceolatus* sobre a TAME, ocorreu de modo crescente, até atingir um platô (Figura 15).

A neutralização da atividade TAME esterásica foi realizada mediante incubação prévia por uma hora da peçonha com os imunesoros (Anti-BL ou Anti-FII) e constatada mediante a redução da hidrólise enzimática comparada ao observado pela peçonha (controle), no tempo de 10 minutos. A neutralização desta atividade foi proporcionada por ambos os imunesoros e de modo significativo ($P < 0,05$) a partir da concentração de $60\mu\text{g}/3\text{mL}$ (Figura. 16).

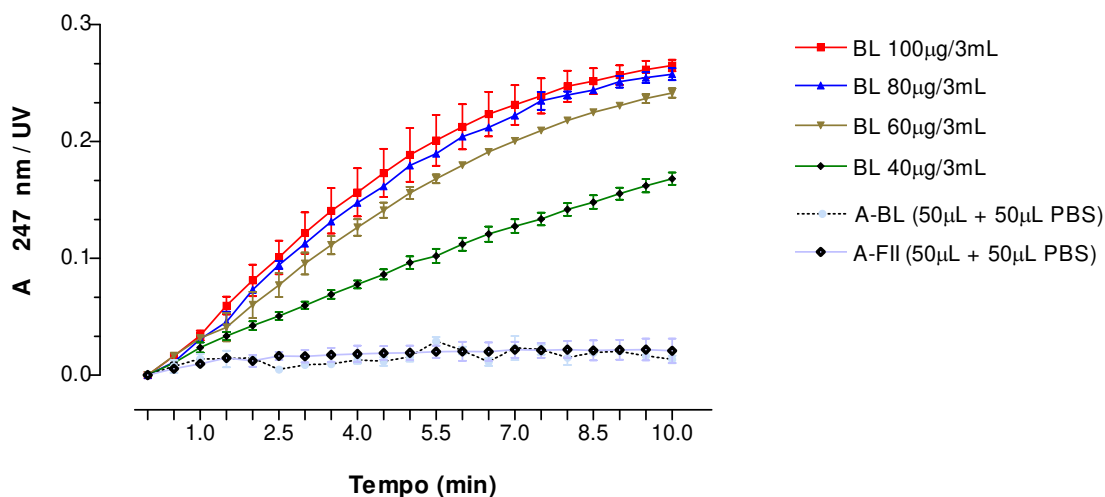


Figura 15- Cinética da atividade TAME Esterásica da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) e dos imunesoros.

Para determinar a atividade TAME esterásica, utilizou-se $100\mu\text{L}$ da peçonha da *Bothrops lanceolatus* ($100\mu\text{g}$, $80\mu\text{g}$, $60\mu\text{g}$ e $40\mu\text{g}$) foram adicionados a $1,5\text{mL}$ de TAME (0.001M em Tris HCl 0.05M pH 7.5) mais $1,4\text{mL}$ de Tampão Tris HCl 0.1M pH 7.8, formando 3mL de solução. Os imunesoros (Anti-BL e Anti-FII) foram testados juntamente com PBS ($50\mu\text{L}$ + $50\mu\text{L}$) para observar a sua atividade sobre o TAME. Para o branco da reação utilizou-se o tampão Tris. Média \pm E.P.M. ($n = 4$, triplicata).

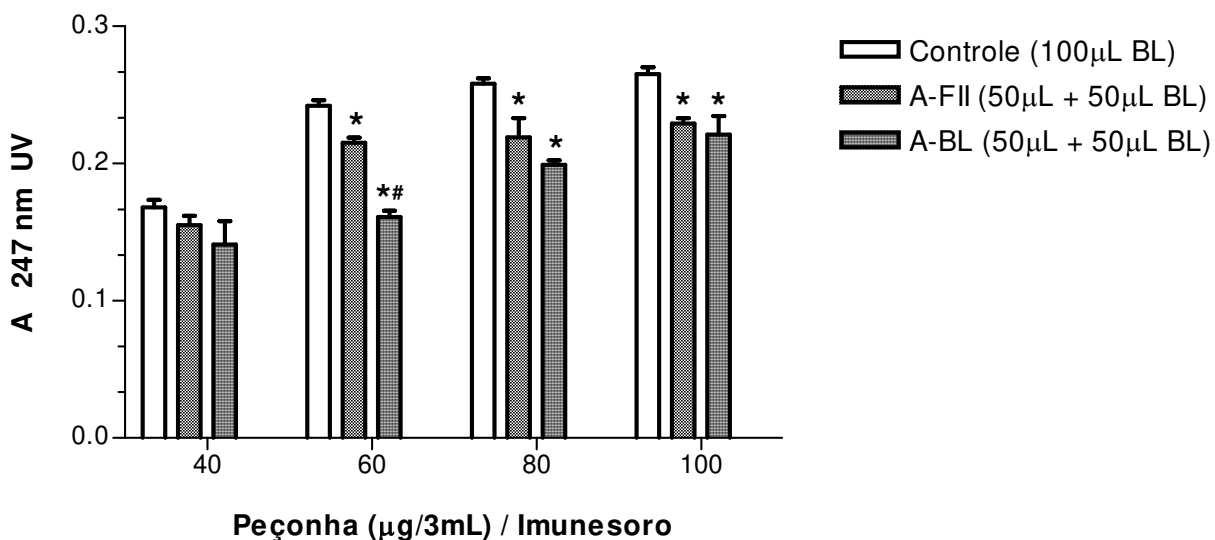


Figura 16- Neutralização da Atividade TAME Esterásica da Peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL).

A neutralização da atividade TAME esterásica foi obtida após incubação prévia por 1 hora a 30°C de 50µL dos imunesoros com o mesmo volume da peçonha (40µg, 60µg, 80µg e 100µg). Após a incubação, foram adicionados 1,5 mL de TAME e 1,4 mL de Tampão Tris, formando 3mL de solução. O controle foi realizado apenas com a peçonha. O tratamento estatístico foi realizado no tempo de 10 minutos. Cada ponto representa a Média ± E. P. M. (n = 4, triplicata). (ANOVA e Tukey).

* $P < 0,05$ diferenças significante entre a peçonha da BL e os imunesoros.

$P < 0,05$ diferenças significante entre os imunesoros.

4.5.5- Atividade coagulante sobre o fibrinogênio

Como demonstrado na Figura 17, quanto maior a concentração da peçonha menor foi o tempo para a formação de fibrina. Em nosso experimento, foi demonstrada a atividade fibrinolítica (tipo - trombina) da peçonha da *Bothrops lanceolatus* sobre o fibrinogênio em diversas concentrações, esta foi apresentada através da formação de fibrina que causou aumento de turbidez quando lidas a 340nm em leitor de ELISA (Carson et al., 1988; Urano et al., 1989; Couto et al., 2004).

A neutralização da atividade coagulante sobre o fibrinogênio foi realizada mediante incubação prévia por uma hora a 30°C da peçonha com os imunesoros (Anti-BL ou Anti-FII) e constatada mediante o aumento do tempo na formação de fibrina (através do aumento de turbidez) comparada ao observado pela peçonha (controle) na leitura de 0,050 a 340nm. A neutralização desta atividade foi proporcionada por ambos os imunesoros em todas as concentrações e de modo marcante pelo Anti-BL (Figura 18).

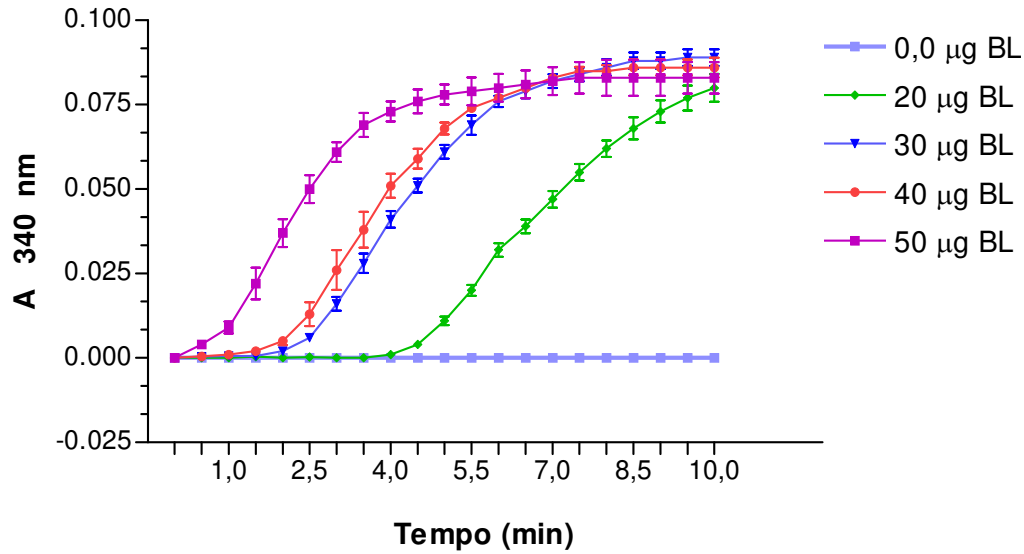


Figura 17- Cinética da atividade coagulante da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) sobre o fibrinogênio humano.

O volume de 30µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (0.0µg, 20µg, 30µg, 40µg e 50µg) foi adicionado a 150µL de fibrinogênio (2mg/mL em tampão PBS 0.5M, pH 7.2) e 20µL de tampão Tris 0.1M, pH 7.4, formando 200µL de solução. Para o branco da reação, utilizamos o tampão Tris. A leitura foi realizada a 340nm por 10 minutos a 37°C. Cada ponto representa a Média ± E.P.M. (n=4, triplicata).

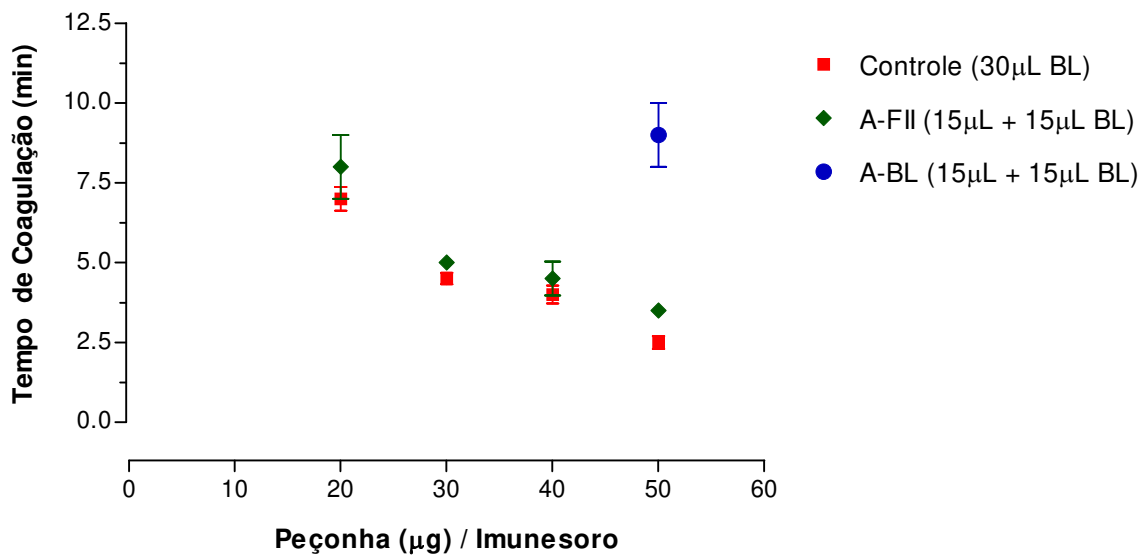


Figura 18- Neutralização da atividade coagulante da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (BL) sobre o fibrinogênio humano.

Para realizar a neutralização da atividade coagulante, 15µL da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (0.0µg, 20µg, 30µg, 40µg e 50µg) foram adicionadas a 15µL dos soros e incubados por uma hora a 30°C, em seguida foram adicionados 150µL de fibrinogênio (2mg/mL de tampão PBS) juntamente com 20µL de tampão Tris 0.1M, pH 7.4, formando 200µL de solução. A leitura foi realizada a 340nm durante 10 minutos a 37°C. Para controle da reação, utilizamos apenas a peçonha. A análise foi realizada no tempo em que a turbidez das amostras atingiram a leitura de 0,05 a 340nm. Cada ponto representa a Média ± E.P.M. (n=4, triplicata).

5- DISCUSSÃO

O estudo dos venenos ao longo do século passado evoluiu muito e vários ramos de pesquisa têm brotado desta área de conhecimento e outras se associaram a ela devido à grandiosidade de substâncias contidas nestas peçonhas, a maioria delas sem conhecimento aprofundado (Sant' Anna, 2007).

No final do século XIX, surgiu um grande pesquisador, Vital Brazil, pioneiro em pesquisas com animais peçonhentos, principalmente as peçonhas ofídicas. Este pesquisador preocupado com os assuntos de saúde pública começava no Brasil, estado de São Paulo, na cidade de Botucatu estudos sobre os envenenamentos causados por serpentes. Estas eram capturadas pelos agricultores e levadas a Vital Brazil, que as mantinha para fins experimentais, testando vários tipos de ervas e credices populares. Vital Brazil também construiu vários instrumentos para capturar e manipular estes animais, bem como formas de extração de seus venenos (Búcher, 1980).

A especificidade dos soros antiofídicos também foi descrito pela primeira vez por Vital Brazil, que verificou que os imunesoros produzidos por Calmett, em Paris no Instituto Pasteur, não neutralizavam o veneno das serpentes brasileiras. A partir desta constatação, Vital Brazil iniciou a elaboração de imunesoros produzidos em animais a partir do veneno das serpentes brasileiras (Brazil, 1901; 1911; 1914; Wen, 2003; Sant' Anna, 2007).

Muitas pesquisas e soros antiofídicos produzidos por Vital Brazil e seus discípulos, sempre tiveram o objetivo de neutralizar a atividade letal destes venenos em vítimas acidentadas e posteriormente as atividades específicas dos mesmos, baseando-se, principalmente, na observação de fenômenos biológicos. Assim, o retardo na melhoria da qualidade dos imunesoros não se deu pela falta de meios e técnicas científicas, mas sim, pelo limitado conhecimento das funções biológicas dos venenos e do sistema imunológico. As melhorias e inovações que ocorreram na produção de antivenenos foram devidas as tentativas e erros (Chippaux e Goyffon, 1998).

Os soros antiofídicos são resultados de esquemas de imunização que utilizam a resposta imunológica do animal para a produção de anticorpos específicos, fatores, como a separação dos plasmas hiperimunes que utilizam mecanismos químicos e físicos para a sua purificação, contribuem para a melhoria destes soros. Algumas descobertas científicas, como a utilização da pepsina tanto para reduzir as imunoglobulinas, como também para a obtenção de um produto final com maior estabilidade foram iniciadas por Pope em 1939 e só foram utilizadas no Brasil, em processos industriais na década de 50, no Instituto Pinheiros e na década de 60, pelo Instituto Butantan (Latifi e Manhour, 1966). Este procedimento melhorou muito a qualidade dos soros antiofídicos produzidos industrialmente.

O mecanismo de ativação do sistema imunológico é semelhante em todos os mamíferos, existindo poucas diferenças nas respostas humorais e celulares, estando ligadas aos receptores de superfícies celulares ou as subclasses de imunoglobulinas (Fernandes, et al., 2000). Estudos sobre as peçonhas e suas atividades sobre os sistemas biológicos são realizados utilizando várias espécies animais, como cães, gatos, pombos, ratos, camundongos, e outros, porém a mais comum são os camundongos. A linhagem heterogênica de camundongos é bem utilizada devido a sua disponibilidade para uso, valor e resistência. Para algumas áreas científicas, os animais isogênicos (camundongos em particular) fornecem um modelo para estudos de interações moleculares, celulares e de controle genético da resposta imune. Apesar da possibilidade do modelo animal isogênico oferecer esclarecimentos, este apresenta restrições, que podem dificultar a interpretação dos resultados e levar a conclusões errôneas (Biozzi et al., 1985; Stephano et al., 2005).

Diante disso, optamos em nosso modelo experimental utilizar camundongos Swiss, para serem imunizados com eritrócitos de carneiro (EC), devido ao fato de ter a sua propriedade antigênica bastante conhecida e por ser um antígeno timo dependente (Dos-Santos et al., 1986; Stephano et al., 2005).

Baseado em observações laboratoriais e clínicas (Ilha da Martinica) notaram-se que o imunesoro comercial anti-*Bothrops lanceolatus* (Anti-BL) produzido em eqüinos possui baixa capacidade de neutralização da peçonha da *Bothrops lanceolatus* (Faria et al., 2001; Thomas et al., 2006) quando comparado aos imunesoros específicos produzidos para outras serpentes. Esta observação nos levou a analisar os efeitos da peçonha de *Bothrops lanceolatus* sobre o sistema imunológico de camundongos imunizados com eritrócito de carneiro.

Os experimentos iniciais demonstraram claramente o efeito inibitório do veneno total da *Bothrops lanceolatus* sobre a resposta imune humoral dos animais imunizados com eritrócitos de carneiro, tanto na resposta primária quanto na secundária.

É conveniente elucidar que esta atividade inibitória sobre a resposta imune humoral de camundongos Swiss que a peçonha da *Bothrops lanceolatus* causou não é decorrente de altas concentrações de antígenos inoculados, uma vez que a concentração utilizada neste trabalho seguiu o modelo descrito por Stephano et al., (2005), os quais estudaram o veneno de *Lachesis muta muta* e demonstraram que a resposta imune humoral de camundongos HGP (High General Primary Response) a antígenos sem relação antigênica (eritrócitos de carneiro) não ocorria devido à concentração protéica.

O efeito inibitório da peçonha da *Bothrops lanceolatus* sobre a resposta imune humoral de camundongos Swiss nos levou a investigar se este efeito estava presente também em alguma de suas frações. Desta forma, foi realizada cromatografia em Sephadex G-100, e obtida três frações, que foram testadas e caracterizadas *in vivo* e *in vitro* quanto as suas atividades.

As frações obtidas foram testadas quanto a sua atividade sobre a resposta imune humoral de camundongos Swiss imunizados com eritrócitos de carneiro. Ao exemplo do que ocorreu com o veneno total, a fração I (FI) mostrou significativa diminuição do título de anticorpos aos eritrócitos de carneiro, tanto na resposta primária quanto na resposta secundária. A memória imunológica foi

mantida para o antígeno de eritrócitos de carneiro, uma vez que os títulos de anticorpos foram maiores do que os apresentados na resposta primária.

Ao analisarmos a fração II (FII), observamos que esta não possui atividade inibitória significativa sobre a resposta imune humoral aos eritrócitos de carneiro, isso demonstra que a atividade inibitória se concentrou praticamente na fração I. Resultados semelhantes também foram observados por Dos-Santos et al., (1986) com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* e por Stephano et al., (2005) com o veneno de *Lachesis muta muta*.

O efeito inibitório da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e da fração FI sobre a resposta imune humoral de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro, nos instigou a produzir um imunesoro a partir da fração (FII) que não apresentou significativo efeito inibitório. Sabe-se que para se produzir imunesoros de boa qualidade é necessário observar pontos como, a escolha do imunógeno, via de administração e uso de adjuvantes (Cardoso et al., 2003).

Sabe-se que várias espécies animais são utilizadas na produção de soros hiperimunes: coelhos, cães, ovinos, caprinos e eqüinos (Bismuth et al., 1996; Chippaux e Goyffon, 1998). A espécie mais utilizada para a produção industrial dos soros para uso terapêutico são os eqüinos devido a uma série de vantagens que estes apresentam em comparação com as demais espécies (Cardoso et al., 2003).

A partir destes dados, imunizamos coelhos utilizando como imunógeno a FII obtida da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e realizamos análises paralelas *in vivo* e *in vitro* com o imunesoro comercial produzidos em eqüinos com o veneno total da *Bothrops lanceolatus*. Ao analisarmos os títulos de anticorpos (concentrações séricas) *in vitro* através do teste de imunodifusão e imunoensimático (ELISA) observamos que os títulos obtidos com o imunesoro Anti-FII foram maiores que o obtido com o imunesoro comercial Anti-BL. Esses imunesoros apresentaram reação cruzada contra o veneno da *Bothrops jararaca*, porém com menor intensidade. Resultados semelhantes já

foram obtidos com o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Higashi et al., 1989) e *Lachesis muta muta* (Stephano et al., 2005).

Conscientes de que os acontecimentos fisiopatológicos causados em um acidente ofídico podem estar ligados à associação de uma ou mais substâncias (atuando sinergicamente ou não) presentes na peçonha, e que a produção de anticorpos específicos é capaz de neutralizar estes componentes do veneno, passamos então a utilizar os imunesoros com o intuito de neutralizar algumas atividades biológicas presentes no veneno da *Bothrops lanceolatus*.

A atividade hemorrágica da peçonha da *Bothrops lanceolatus* é devida à ação de metaloproteinases que contém zinco em sua estrutura, as quais atuam fragilizando a integridade do endotélio vascular (Stroka et al., 2005). A neutralização desta atividade ocorreu com os imunesoros Anti-BL e Anti-FII, sendo mais eficaz com o imunesoro comercial (Anti-BL), pelo fato das proteínas com atividade hemorrágica estarem mais concentrada na fração FI conforme demonstrado na Figura 4. A neutralização desta atividade da peçonha de *Bothrops lanceolatus* também foi descrita com antivenenos específicos por Bogarín et al., (1999), Stroka et al., (2005) e com polivalente por Gutiérrez et al., (2008).

Toxinas com atividade hemorrágica presente nas peçonhas iniciam suas ações logo após a picada e quando a vítima é admitida no serviço hospitalar os danos causados pelas hemorragias já ocorreram, não sendo relevante a utilização de imunesoros com alta capacidade de neutralização, já que esta atividade se instala logo após o envenenamento.

A peçonha da *Bothrops lanceolatus* possui atividade hemolítica indireta devido à presença de fosfolipase A_2 (PLA₂) (Lôbo de Araújo et al., 1994) com atividade anticoagulante *in vitro* (Lôbo de Araújo et al., 2001), este fato pode estar associado aos casos de envenenamento em que algumas vítimas apresentavam sangue incoagulável (Estrade et al., 1989; Thomas et al., 1998). A atividade hemolítica indireta das peçonhas Viperídeas ocorre devida à presença de

fosfolipases que são comuns em peçonhas botrópicas (França e Mâlaque, 2003). A atividade hemolítica é devida à ação catalítica das PLA₂, com a formação de lisofosfolipídios, que atuam sobre a membrana plasmática como tensoativos, aumentando a permeabilidade e subseqüente acesso aos fosfolipídios da bicamada.

Martins, (2006) determinou a atividade hemolítica no veneno da *Bothrops lanceolatus* utilizando eritrócitos de carneiro e de outras espécies animais, já que a PLA₂ na presença de cálcio forma hemolisina. Os imunesoros Anti-BL e Anti-FII, foram utilizados para neutralizar esta atividade e observamos que o Anti-FII neutralizou a atividade hemolítica de maneira mais eficiente do que o Anti-BL, provavelmente pelo fato da atividade PLA₂ estar concentrada na fração FII (Figura 4).

Como descrito por Lôbo de Araújo et al., (1998) o veneno da *Bothrops lanceolatus* possui alta atividade proteolítica sobre a caseína quando comparado com peçonhas de mesmo gênero. A utilização dos imunesoros Anti-BL e Anti-FII para neutralizar a atividade proteolítica sobre a caseína, mostrou novamente que o Anti-FII foi mais eficaz na neutralização desta atividade que o Anti-BL.

A atividade esterásica sobre o substrato TAME ocorre devido à presença de hidrolases de ésteres de aminoácidos básicos que possuem vários fatores em comum com as enzimas tipo-trombina nas peçonhas do gênero *Bothrops*. A peçonha da *Bothrops lanceolatus* possui atividade coagulante sobre o fibrinogênio de forma direta, degradando primeiro a cadeia A- α e mais lentamente a cadeia B- β do fibrinogênio (Lôbo de Araújo et al., 1998). Tal fato associado à não coagulação do plasma pode ocorrer devido aos inibidores inespecíficos presentes no meio plasmático. A peçonha da *Bothrops lanceolatus* promove ainda o aumento do tempo de trombina parcialmente ativada (TTPA), no plasma humano sugerindo a presença de um inibidor da cascata de coagulação (Lôbo de Araújo et al., 2001). De posse desses conhecimentos também utilizamos os imunesoros Anti-BL e o Anti-FII com o objetivo de neutralizar essas atividades, coagulante sobre o fibrinogênio e esterásica sobre TAME. O imunesoro comercial

(Anti-BL) foi mais evidente em neutralizar a atividade coagulante, já a atividade esterásica sobre o TAME foi igualmente neutralizada por ambos os imunesoros.

Os resultados apresentados a partir deste estudo permitem sugerir que os efeitos desta peçonha da *Bothrops lanceolatus* sobre o sistema imune humoral devem ser estudados mais detalhadamente e com possibilidades de isolar e caracterizar frações com efeito inibitório sobre o sistema imune humoral, até mesmo com a possibilidade de uso terapêutico como uma substância supressora. Com relação à soroterapia, esta poderia ser melhorada se fossem retirados apenas os componentes inibidores para que fossem produzidos imunesoros anti-*Bothrops lanceolatus* com maior eficácia na neutralização das atividades biológicas identificadas nos acidentes ocasionados por esta serpente e após comprovação através de testes *in vivo* e *in vitro* de sua eficácia, fosse sugerido para uso terapêutico.

É importante salientarmos que existem poucas publicações, que relatam o efeito das peçonhas atuando sobre o sistema imunológico. Como já mencionado, desenvolvemos um imunesoro capaz de neutralizar atividades biológicas importantes descritas no envenenamento induzido pela peçonha da *Bothrops lanceolatus*.

Sobre estas condições verificamos que existe a possibilidade de produzir imunesoros a partir de imunógenos selecionados capazes de neutralizarem de forma significativa boa parte das atividades da peçonha da *Bothrops lanceolatus* e que novos estudos com este foco são necessários.

6- CONCLUSÕES

Sobre estas condições este trabalho concluiu que:

- a) Tanto a peçonha total quanto a fração I isolada da *Bothrops lanceolatus* apresentaram ação inibitória sobre a resposta imune humoral de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro.
- b) A fração II isolada da *Bothrops lanceolatus* apresentou menor efeito inibitório sobre a resposta imune humoral de camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro.
- c) Coelhos imunizados com a fração II isolada da peçonha da *Bothrops lanceolatus* produziram um imunesoro com título de anticorpos superior ao imunesoro comercial (Anti-BL) quando testados por imunodifusão e ELISA.
- d) Ambos os imunesoros neutralizaram as atividades da peçonha da *Bothrops lanceolatus*, porém o Anti-FII foi mais eficiente em neutralizar as atividades hemolítica e caseinolítica e o Anti-BL as atividades hemorrágica e coagulante. A esterásica foi igualmente neutralizada por ambos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.3 - 40.

Abbas AK, Lichtman AH. Tolerância imunológica. In: *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.225 - 248.

Abbas AK, Lichtman AH. Doenças causadas por respostas imunes: Hipersensibilidade e auto-imunidade. In: *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.423 - 43.

Abreu VA, Dal Belo CA, Hernandez-Oliveira SS, Borja-Oliveira CR, Hyslop S et al.. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007; 148(1): 142 - 9.

Assakura MT, Reichil AP, Asperti CA, Mandelbaum FR. Isolation of the major proteolytic enzyme from the snake *Bothrops moojeni*. *Toxicon* 1985; 23: 691 - 706.

Aragon-Ortiz F, Gubensek F. Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (torciopelo) snake venom. *Toxicon* 1987; 25: 759 -66.

Araújo PMF, Holmberg D, Martines-A C, Coutinho A. Idiotypic multireactivity of “natural” antibodies: Natural anti-idiotypes also inhibit helper cells with cross-reactive clonotypes. *Scand J Immunol* 1987; 25: 497 - 505.

Arruda VA, Araújo PMF, Bon C, Lôbo de Araújo A. *Bothrops lanceolatus* (Fer De Lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. *Toxicon* 2003; 41: 99 - 107.

Aurell L, Friberger P, Karlsson G, Claesson G. A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for factor Xa. *Thromb. Res* 1977; 11: 595 - 609.

Bachman F, Duckert F, Koller F. The Stuart-Prower factor assay and clinical significance. *Thrombos. Diathes. Haemorrh* 1959; 2: 24 - 38.

Bakhle YS. Conversion of angiotension I to angiotension II by cell free extracts of dog lung. *Nature* 1968; 220: 919 - 21.

Beghini DG, Tyama MH, Hyslop S, Sode KL, No Vello JC, Marangoni S. Enzimática Characterization of a Novel Phospholipase A₂ from *Crotalus dirissus cascavella* rattlesnake (maracamboia) Venom. *J. Protein Chem* 2000; 19 (7): 603 - 7.

Beghini DG, da Cruz-Höfling MA, Randazzo-Moura P, Rodrigues-Simioni L, et al.. Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 2005; 46(6): 604 - 11.

Belo CA, Toyama MH, Toyama Dde O, Marangoni S, Moreno FB et al. Determination of the amino acid sequence of a new phospholipase A(2) (MIDCA1) isolated from *Micrurus dumerilii carinicauda* venom. *Protein J* 2005; 24(3): 147 - 53.

Biozzi G, Mounton D, Siqueira M, Stiffel C. Effect of genetic modification of immune responsiveness on anti-infection and anti-tumor resistance. In: Skamene E. Genetic control of host resistance to infection and malignancy. New York: Allan R Liss Inc; 1985. p. 3 - 18.

Bismuth C, Baud FJ, Borron SW, Scherramann JM. Antibodies proposed as therapeutic agents. *Arch of Toxinol Supply* 1996; 18: 321 - 32.

Bogarín G, Segura E, Durán G, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Evolución de la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Terciópelo) de Costa Rica. *Toxicon* 1995; 33 (9): 1242 - 47.

Bogarín G, Romero M, Rojas G, Lutsch C, Casadamont M, Lang J, Otero R, Gutiérrez JM. Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1999; 37 (3): 551 - 7.

Boquet P. Immunological properties of snake venoms. In: Lee CY. Snake venoms. Handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer-Verlag; 1979. (52). P.751 - 854.

Bottger EC, Hoffmann T, Merzger S, Hadding U, Bitter-Suerman D. The role and mechanism of cobra venom factor induced suppression of the humoral immune response in guinea pigs. The Journal of Immunology 1986; 137: 2280-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde 1998.

Brazil V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico, II (Brazil 1901). Veneno de algumas espécies brasileiras. Revista Médica de São Paulo 1901; (4): 375-80.

Brazil V. La défense contre l'ophidisme. São Paulo 2^a ed Pocaí and Weis; 1911. p.48.

Brazil V. La Défense contre l'Ophidisme. Paris 2^{ème} ed; 1914. p.200 - 16.

Bucarechi F, Hyslop S, Mello SM, Vieira RJ. *Bothrops* snakebite on the head: case report and review of the literature. Ann Trop Med Parasitol. 2007; 101(8): 733 - 43.

Búcher W. Vital Brazil e as Serpentes. In: Acúleos que Matam "No mundo dos Animais Peçonhentos". Rio de Janeiro: Livraria Kosmos Editora; 1980. p.133 - 42.

Bucher B, Canonge D, Thomas L, Tyburn B, Robbe-Vincent A, Choumet V, et al.. Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. Research group on snake bites in Martinique. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91 (2): 186 - 90.

Calich VLG, Kipnis TL, Dias da Silva W, Alper CA, Rosen NFS. Brazilian snake serum and venom: Studies of the alternative pathway and C3 in man and serpent. In: 7th International Complement Workshop, St. Peterburg Beach, Florida, (Abstracts) 1977; 20 - 2.

Calmette A. Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunization des animaux et traitement de l'envenimation. Annales du Institute Pasteur 1894; 8: 275 - 971.

Camey KU, Velarde DT, Sanchez EF. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. Toxicon 2002; 40: 501 - 9.

Cardoso DF, Yamaguchi IK, Moura da Silva AM. Produção de Soros Antitoxinas e Perspectivas de Modernização por Técnicas de Biologia Molecular. In: Cardoso JLC, França FSO, Wen FH, Mâlaque CMS, Haddad Jr V. Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p.367 - 79.

Cardoso DF, Mota I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. Toxicon 1997; 35: 607 - 12.

Carlson RH, Garnick RL, Jones AJ, Meunier AM. The determination of recombinant human tissue-type plasminogen activator activity by turbidimetry using a microcentrifugal analyzer. Analytical Biochemistry 1988; 168: 428 - 35.

Cavalcante WL, Campos TO, Dal Pai-Silva M, Pereira PS, et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. J Ethnopharmacol 2007; 112 (3): 490 - 7.

Chatterjee I, Chakravarty AK, Gomes A. *Daboia russellii* and *Naja kaouthia* venom neutralization by lupeol acetate isolated from the root extract of Indian sarsaparilla *Hemidesmus indicus* R.Br. J Ethnopharmacol. 2006; 106(1): 38 - 43.

Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon 1998; 6: 823 - 46.

Cochrane JP, Muller-Eberhard HJ, Aikin BS. Depletion of plasma complement in vivo by a protein of cobra venom its effect on various immunologic reactions. The Journal of Immunology 1970; 105: 55 - 69.

Cogo JC, Lilla S, Souza GH, Hyslop S, de Nucci G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2 from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Biochimie* 2006; 88(12): 1947 - 59.

Commissio European Pharmacopeia. *European Pharmacopoeia*. Strasbourg: Third Edition Council of Europe; 1998. p.1543 - 5.

Coutinho A, Marquez C, Araújo PMF, Pereira P, Toribio ML, Marcos MAR, et al.. A functional idiotype of T helper cells and antibodies, limited to the compartment of “*naturally*” activated lymphocytes in normal mice. *Eur J Immunol* 1987; 17: 821 - 25.

Couto LT, Donato JL, De Nucci G. Analysis of five streptokinase formulations using the euglobulin lysis test and the plasminogen activation assay. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37 (12): 1889 - 94.

Dal Pai V e Neto HS. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: Barravieira B. *Venenos Animais - Uma Visão Integrada*. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda); 1994. p. 97 - 105.

Danse JM, Gasparini S, Ménez A. Molecular biology of snake venom phospholipase A2. In: *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. England: Ed. Wiley, Chichester, 1997. p. 29 - 71.

Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin - converting enzyme carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 1977; 16: 5484 - 91.

Denson KW. The specific assay of Stuart-Prower factor and factor VII. *Acta Haemat* 1961; 25: 105 - 20.

Dias da Silva W, Guidolin R, Raw I, Higashi HG, Caricati CP, Morais JF, et al. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan* 1989; 51 (4): 153 - 68.

Dos-Santos MC, D'Imperio-Lima R, Dias da Silva W. Influence of *Crotalus* venom on the response to sheep red blood cells. *Braz J Med Biol Res* 1986; 19: 636.

Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The J of Immunol* 1972; 109: 129 - 35.

Engvall E. Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. In: Van Vunakis H, Langone JJ. *Methods of Enzymology - Immunochemical Techniques Part A*, New York, Academic Press; 1980. 70: 419 - 38.

Escalante T, Shannon J, Moura-da-Silva AM, Gutiérrez JM, Fox JW. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. *Arch Biochem Biophys*. 2006; 455(2): 144 - 53.

Estrade G, Garnier D, Bernasconi S, Donatien Y. Pulmonary embolism and disseminated intravascular coagulation after being bitten by a *Bothrops lanceolatus* snake. Apropos of a case. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1989; 82 (11): 1903 - 5.

Faria L, Antunes A, Bon C, Lôbo de Araújo A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer De Lance) venom. *Toxicon* 2001; 39: 825 - 30.

Fernandes I, Lima EX, Takehara HA, Moura da Silva AM, Tanjoni I, Gutiérrez JM. Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. *Toxicon* 2000; 38: 633 - 44.

Ferreira SH. A bradykinin potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Brit J Pharmacol* 1965; 24: 163 - 69.

Ferreira SH, Vane JR. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Brit J Pharmacol* 1967; 108: 323 - 28.

Fischer A. Primary T-cell immunodeficiencies. *Current Opinion in Immunol* 1993; 5: 569 - 78.

Franceschi A, Rucavado A, Moura N, Gutiérrez JM. Purification and characterization of Ball4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 2000; 38: 63 - 77.

França FSO, Mâlaque CMS. Acidentes Botrópico. In: Cardoso JLC, França FSO.; Wen FH, Mâlaque CMS, Haddad Junior V. *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier; 2003. p.450 - 5.

Franco LF. Origem e Diversidade das Espécies. In: Cardoso JLC, França FSO, Wen FH, Mâlaque CMS, Haddad Jr V. *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier. 2003. p.13 - 32.

Freitas, J. C., Nomenclatura em toxilogia. Relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas das toxinas. *Mem. Inst. Butantan* 1991; 53 (2): 191 - 95.

Funk RS. *Reptile Medicine and Surgery: Snakes*. Mader DR. Section II Biology - Snakes. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data; 1996. p.39 - 46.

Gewurz H, Clarck DS, Finstad J, Kelly WD, Varco RL, Good RA, Gabrielsen AE. Role of complement system in graft rejection in experimental animals and man. *Annales of New York Academic Science* 1966; 129: 673 - 80.

Grossman M, Terr AI. Terapia imunológica: Imunização. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. *Imunologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.609 - 21.

Griscelli C, Lisowsks-Giospierre B. Combined immunodeficiency with defective expression in MHC class II genes. *Immunodeficiency Review* 1989; 1: 135 - 53.

Guimarães AQ, Cruz-Hofling MA, Araújo PMF, Bon C, Lôbo de Araújo A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer De Lance) venom induce edema. *Inflamm Res* 2004; 53: 284 - 91.

Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 1984; 22: 115 - 28.

Gutiérrez JM e Cerdas L. Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. *Rev de Biol Trop* 1984; 32: 213 - 22.

Gutiérrez JM, Gené JA, Rojas GE, Cerdas L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venom by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1985; 23: 887 - 93.

Gutiérrez JM, Rojas G, Cerdas L. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala* a new Costa Rica subspecies of bushmaster. *Toxicon* 1987; 25: 713 - 20.

Gutiérrez JM, Ávila C, Rojas E, Cerdas L. Na alyernative in vitro method for testing the potency of the polivalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 1988; 26: 411 - 3.

Gutiérrez JM, Lamonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 211 - 23.

Gutiérrez JM, Lamonte B. Efectos Locales em el Envenenamiento Ofídico em América Latina In: In: Cardoso JLC, França FSO.; Wen FH, Målaque CMS, Haddad Junior V. Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p.310 - 24.

Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández J, Lomonte B, Ângulo Y, et al. Snake venomics of the lasser antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlaction whith toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *J Proteome Res* 2008; 7 (10): 4396 - 408.

Hartree EF. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972; 48: 422 - 27.

Haupt K e Mosbach K. Plastic antibodies: developments and applications. Trends in Biotechnology 1998; 16: 468 - 75.

Higashi HG, Guidolin R, Caricat CP, Fernandes I, Marcelino JR, Morais JF, et al. Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. Memórias do Instituto Butantan 1989; 51: 91-100.

Hofmann H e Bom C. Blood coagulation induced by the venom of the Bothrops atrox. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. Biochemistry 1987b; 780 - 7.

Hoge AR, Romano-Roge SARWL. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. 2ª ed. Mem. Inst. Butantan 1978 / 79; 42/43: 373 - 496.

Homsi-Brandeburgo MI, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodrigues-Simioni L, Glicio JR. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. Toxicon 1988; 26: 615 - 27.

Hospital Vital Brasil. Dados de acidentes por serpentes no Brasil. Fonte: Fundação Nacional de Saúde 1998.

Hudson L, Hay FC. Practical Immunology. Oxford, Blackwell Scientific Publications 1989; 3th ed: 507p.

Hummel BCW. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Canad J Biochem Physiol 1959; 37: 1393 - 7.

Imboden J, Goodwin JS, Davis JJ, Wofsy D. Terapia imunossupressora, antiinflamatória e imunomoduladora. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB. Imunologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.648 - 61.

Janeway ACJ e Travares P. Imunobiologia: O sistema Imunológico na Saúde e na Doença. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997. p.11.10 - 11.11.

Jerne NK. Toward a network theory of the immune system. Ann Immunol 1974; 125C: 373 - 89.

Jim J e Sakate M. Biologia das Serpentes. In: Barravieira B. Venenos Animais - Uma Visão Integrada. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda); 1994. p.109 - 34.

Jorge MT, Ribeiro LA. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpentes *Bothrops jararaca* adulta e filhote. Hosp Clin Fac Méd S Paulo 1989; 44:143 - 45.

Kaiser II, Gutiérrez JM, Plummer I, Aird SL, Odell GU. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. Arch Biochem Biophys 1990; 278 (2): 3190- 25.

Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. Toxicon 1996; 34: 627 - 42.

Kirby EP, Niewiarowski S, Stockin K, Kettiver C, Shan E, et al. Thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* venom. I. Purification and characterization of the enzyme. Biochemistry 1979; 18: 3564 - 70.

Kolin J, Braren I, Bredehorst R, Spillner E. Purification of native and recombinant cobra venom factor using thiophilic adsorption chromatography. Protein Pept Lett 2007; 14(5): 475 - 80.

Kondo H, Kondo S, Ikezawa H, Murata R, Ohsaka A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. Jpn J Med Sci. Biol 1960; 13: 43 - 8.

Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J Gen Physiol 1947; 32: 291 - 310.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680 - 5.

Laing GD, Yarleque A, Marcelo A, Rodriguez E, Warrell DA, Theakston RDG. Preclinical testing of three south American antivenoms against the venoms of five medically-important peruvian snake venoms. *Toxicon* 2004; 44: 103 - 6.

Laman JD, Claassen E, Noelle RJ. Immunodeficiency due to a faulty interaction between T cells and B cells. *Curr Opin in Immunol* 1994; 6: 636 - 41.

Lamb G, Hanna W. Specificity of antivenomous sera. *Scientific Memories by Officers of the Medical and Sanitary Department of the Governament of India* 1904; 10: 1 - 25.

Lang Baliija M, Vrdojak A, Habjanec L, Dojnovic´ B, Halassy B, Vranesic´ B, et al.. The variability of *Vipera ammodytes ammodytes* venoms from Croatia--biochemical properties and biological activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005; 140 (2): 257 - 63.

Latifi M, Manhour H. Antivenim production. *Memórias do Instituto Butantan*. 1966; 33: 893 - 8.

Lôbo de Araújo A e Radvanyi F. Detemination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 1987; 25: 1181 - 8.

Lôbo de Araújo A. Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus* [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1990.

Lôbo de Araújo A, Donato JL, Moreno RA, Prado-Franceschi J. Comparison of the phospholipase A2, Blood-clotting, caseinolytic esterolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. In: *Third Pan American Synposium on animal, Plant and Microbial Toxins*. Oaxtepec. *Toxicon* 1990; 28: 601p.

Lôbo de Araújo A, Radvanyi, F, Bon C. Purification of an acidic phospholipase A2 from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. *Toxicon* 1994; 32: 1069 - 81.

Lôbo de Araújo A, Donato JL, Bon C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom of a fibrino(geno)lytic enzyme with esterolytic activity. *Toxicon* 1998; 36: 745 - 58.

Lôbo de Araújo A, Souza AO, Cruz-Ho"fling MA, Flores CA, Bon C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venoms induce oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. *Toxicon* 2000; 38: 209 - 21.

Lôbo de Araújo A, Kamiguti A, Bon C. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom. *Toxicon* 2001; 39: 371 - 5.

Lôbo de Araújo A, Donato JL, Leite GB, Prado-Franceschi, J, Fontana MD, Bom C, et al. Neuromuscular Action of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) Venom and a Caseinolytic Fraction. *Toxicon* 2002; 40: 1283 - 89.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265 - 75.

Mader DJ. Clinical Techniques. Basic Approach to Veterinary Care. In: Quesenberry KE, Carpenter JW. Ferrets, Rabbits, and Rodents. *Clinical Medicine and Surgery*. Saunders Elsevier; 2004. p.151.

Malbranque S, Piercechi-Marti MD, Thomas L, Barbey C, Courcier D, Bucher B, et al.. Fatal diffuse thrombotic microangiopathy after a bite by the [quot] Fer-de-Lance[quot] pit viper (*Bothrops lanceolatus*) of Martinique. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(6): 856 - 61.

Mahadeswaraswamy YH, Nagaraju S, Girish KS, Kemparaju K. Local tissue destruction and procoagulation properties of *Echis carinatus* venom: inhibition by *Vitis vinifera* seed methanol extract. *Phytother Res* 2008; 22(7): 963 - 9.

Mandelbaum FR, Reichel AP, Assakura MT. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: Animal, plant and Microbial Toxins. (Ohsaka A, Hayashi K, Sawai Y., eds). London, Plenum Press 1976; 111 - 21p.

Mandelbaum FR, Reichel AP, Assakura MT. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon* 1982; 20: 955 - 72.

Mandelbaum FR, Assakura MT, Reichel AP. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the snake venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon* 1984; 22: 193 - 206.

Martins LJ. Estudo da atividade hemolítica induzida pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) *in vitro* [Tese de Mestrado] Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Martinelli GP, Matsuda T, Osler AG. Studies on immunosuppression by cobra venom factor. I On early IgG and IgM responses to sheep erythrocytes and DNP-protein conjugates. *The J of Immunol* 1978a; 121: 2043 - 47.

Mebis D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem* 1970; 1: 335.

Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, Ramalingam S. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. *Toxicon* 2008; 52(2): 221 - 7.

Meier J, Adler C, Weiss N. Determination of batroxobin levels in the plasma of guinea pigs after epicutaneous and intravenous applications. *Toxicon* 1988; 26: 964 - 6.

Melgarejo RA. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso CLJ, Siqueira França OF, Wen HF, Santàna Maláque MC, Haddad JV. *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier; 2003. p.33 - 62.

Mendes MM, Oliveira CF, Lopes DS, Vale LH, Alcântara TM, et al. Anti-snake venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. *Phytother Res*. 2008; 22(7): 859 - 66.

Merck Sharpe e Dohme, Fraser CM. Manual Merck de Veterinária. Valores e Procedimentos Clínicos: 1ª Ed. Roca; 1991. Pp. 983 - 7.

Merle H, Donnio A, Ayeboua L, Plumelle Y, Smadja D, Thomas L. Occipital infarction revealed by quadransopia following snakebite by *Bothrops lanceolatus*. Am J Trop Med Hyg 2005; 73 (3): 583 - 5.

Mérens A, Petitjeans F, Gidenne S, Debien B, De Rudnicki S, Fontan E, et al.. Severe hypofibrinogenemia after rattlesnake envenomation in France. Ann Biol Clin (Paris) 2005; 63(2): 220 - 4.

Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. Cell Mol Life Sci. 2008; 65(18): 2897 - 912.

Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. Cell Mol Life Sci 2008; 65 (18): 2897 - 912.

Moreira V, Gutiérrez JM, Soares AM, Zamunér SR, Purgatto E, et al. Secretory phospholipase A(2) isolated from *Bothrops asper* and from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms induce distinct mechanisms for biosynthesis of prostaglandins E2 and D2 and expression of cyclooxygenases. Toxicon 2008; 52 (3): 428 - 39.

Moura da Silva AM, D'Império-Lima MR, Nishikawa AK, Brodskyn CI, Dos Santos MC, Furtado MFD, et al. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of Genus *Bothrops*. Toxicon 1990; 28 (2): 181 - 8.

Moura da Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. Toxicon 1990; 28 (11): 1293 -1301.

Muruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara H. Broad substrate specificity of the snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in hemorrhage. Toxicon 1992; 30: 1387 - 97.

Muruyama M, Tonigawa M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H. Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. *Enzyme Protein* 1993; 47: 24 - 35.

Nahas L, Denson KWE, Macfarlane RG. A study of the coagulant action of eight snake venoms. *Thromb Diath Haemorrh* 1964; 12: 355 - 67.

Nahas L, Kamiguti AS, Barros MAR. Thrombin - like and factor X - activator components of *Bothrops* snake venom. *Meth. Enzymol* 1979; 45: 205 - 14.

Neville DM. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *Journal of Biological Chemistry* 1971; 246: 6328 - 34.

Numeric P, Moravie V, Didier M, Chatot-Henry D, Cirille S, Bucher B, et al. Multiple cerebral infarctions following a snakebite by *Bothrops caribbaeus*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 67 (3): 287 - 8.

Ohasaka A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: *Handbook of Experimental Pharmacology. Snake Venom.* Berlin Springer: Ed Lee CY; 1979. p.480 - 546.

Oliveira Lima A, Dias da Silva W. *Imunologia Imunopatologia Alergia Métodos.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1970. p.559 - 73.

Ondetti MA, Williams NJ, Sabo EF, Pluscec J, Weaver ER, Kocy O. Angiotension converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure and synthesis. *Biochemistry* 1971; 10: 4033 - 9.

Ouchterlony O, Nisson LA. Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. In: Weir DM. *Handbook of Experimental Immunology.* Oxford: Blackwell; 1973. p.10 - 2.

Oudin J. Specific precipitation in gel and its application to immunochemical analysis. In: Corcoran AC. *Methods in Medical Research.* Chicago: Year Book Publishers Inc; 1952. p.543.

- Owen MJ, Lamb JR. Immune recognition. Oxford: IRL Prss Inc; 1989. p.73.
- Pérez AV, Rucavado A, Sanz L, Calvete JJ, Gutiérrez JM. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. Braz J Med Biol Res. 2008; 41(1): 12 - 7.
- Pérez AV, Saravia P, Rucavado A, Sant'Ana CD, Soares AM, Gutiérrez JM. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. Tóxicos. 2007; 49(7): 1063 - 9.
- Pifano F, Aguilar I, Giron ME, Gamboa N, Rodriguez-Acosta A. Natural resistance of opossum (*Didelphis marsupialis*) to the mapanare (*Bothrops lanceolatus*) snake venom. Roum Arch Microbiol Immunol 1993; 52 (2): 131 - 6.
- Pinho FMO, Pereira ID. Ofidismo. Artigo de revisão. Assoc Méd Brás 2001; 47 (1): 24 - 9.
- Pope CG. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I-True digestion of the proteins. British J of Exper Pathol 1939; 20: 132 - 49.
- Queiroz LS, Santo Neto H, Assakura MT, Reichl AP, Mandelbaum FR. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon 1985; 23: 341 - 5.
- Rangel-Santos A, Lima C, Lopes-Ferreira M, Cardoso DF. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon 2004; 44: 609 -16.
- Reid PF. Alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: A review of the literature leading to its development for this application. Crit Rev Immunol 2007; 4: 291 -302.
- Rodriguez-Acosta A, Aguilar I, Giron ME. Antivenom activity of opossum (*Didelphis marsupialis*) serum fraction. Toxicon 1995; 33 (1): 95 - 8.

Rodriguez-Acosta A, Aguilar I, Giron ME. Antivenom activity of opossum (*Didelphys marsupialis*) serum fractions against Uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941) venom. Roum Arch Microbiol Immunol 1995; 54 (4): 325 - 30.

Rodriguez-Acosta A, Uzcategui W, Azuaje R, Giron ME, Aguilar I. ELISA assays for the detection of *Bothrops lanceolatus* venom in envenomed patient plasmas. Roum Arch Microbiol Immunol 1998; 57 (3 - 4): 271 - 8.

Rodriguez-Acosta A, Uzcategui W, Azuaje R, Giron ME, Aguilar I. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela: A clinical and epidemiological analysis of accidental bites by snakes of the genus *Bothrops* in Venezuela. Rev Cubana Med Trop 2000; 52 (2): 90 - 4.

Rosenfeld G. Moléstias por venenos animais. Pinheiro Terap 1965; 17: 3 - 15.

Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl W, Buckley E, Deulofeu V. Venenous Animals and their Venoms. New York: Press Academic; 1971. p.345.

Rosenfeld G. Acidentes por animais peçonhentos (serpentes, aranhas, escorpiões). In: Veronesi R. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976. p.970 - 83.

Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Exp Mol Pathol 1995; 63: 186 - 99.

Sai - Agam A, Phongtananant S, Nuchprayoon I. Phospholipase A2 genes and their expressions in Thai Russell's viper venom glands. Toxicon 2008; 52 (2): 395 - 9.

Salgueiro LM, Rodriguez-Acosta A, Rivas-Vetencourt P, Zerpa M, Carillo G, Aguilar I, et al.. Inhibition of Crotalidae venom hemorrhagic activities by *Didelphys marsupialis* liver spheroids culture supernatants. J Nat Toxins 2001; 10 (2): 91 - 7.

Sano-Martins IS, Santoro ML. Distúrbios Homeostáticos em Envenenamentos por Animais Peçonhentos no Brasil. In: Cardoso JLC, França FSO, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ. Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p.289 - 309.

Sant'Anna OA. Immunology in Brazil: historical fragments. Scand J of Immunol 2007; 66: 106 - 12.

Santos MC, Diniz CR, Pacheco MA, Dias da Silva W. Phospholipase A2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon 1988; 26: 207 - 13.

Schosinsky K, Vargas M, Vinocour E, Gonzalez O, Brilha EY, Gutiérrez A. Manual de técnicas de laboratório. San José: Universidad de Costa Rica; 1983.

Schwert GW, Takenaka Y. Espectrophotometric Determination of Trypsin and Chymotrypsin. Biochim Biophys Acta 1995; 16: 578.

Scott DL. Phospholipase A2: Structure and catalytic properties. In: Kini RM. Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure Function and Mechanism. England: Wiley, Chichester 1997; p. 97 - 128.

Shoibonov BB, Osipov AV, Kryukova EV, Zinchenko AA, Lakhtin VM, Tsetlin VI, et al. Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first reprotolysin inhibiting the classical pathway of complement. Mol Immunol 2005; 42 (10): 1141 - 53.

Sitprija V. Animal toxins and the kidney. Nat Clin Pract Nephrol 2008; 4 (11): 616 - 27.

Soares AM, Ticli FK, Marcussi S, Lourenço MV, Januário AH, et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. Curr Med Chem. 2005;12(22): 2625 - 41.

Sthephano MA, Guidolin R, Higashi HG, Tambourgi DV, Sant'Anna OA. The improvement of the therapeutic anti-*Lachesis muta* serum production in horses. Toxicon 2005; 45: 467 - 73.

Stocker K, Fischer H, Meier J. Trombin-like venom proteinases. *Toxicon* 1982; 20: 265 - 73.

Stroka A, Donato L, Bon C, Hyslop S, Lôbo de Araújo A. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon* 2005; 45: 411 - 20.

Sullivan JBJr. Immunotherapy in poisoned patient. Overview of present applications and future trends. *Med Toxicol* 1986; 1: 47 - 60.

Tambourgi DV, Campos ACMR, Freitas MCW, Magnoli F, Dias da Silva W, Von Eickstedt VRD, et al. Manipulation of the complement system by animal venoms. In: Dias da Silva W. Mini-simpósio, sistema complemento: pesquisa de interface. *Memórias do Instituto Butantan* 1992; p.15-9.

Tan PTJ, Khan AM, Bruslic V. Bioinformatics for venom and toxin sciences. *Brief Bioinform* 2003; 4: 53 - 62.

Theakston RDG, Keid MA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. WHO* 1983; 61: 949 - 56.

Thomas L, Tyburn B, Ketterle J, Rieux D, Garnier D, Smadja D. Groupe de Recherche sur la Morsure de Serpent en Martinique - Troubles de la coagulation et thromboses induites par la morsure de serpent (*Bothrops lanceolatus*) chez l'homme en Martinique. *Réanimation Urgence* 1994; 3: 25 - 30.

Thomas L, Tyburn B, Pecout F, Ketterle J, Rieux D, Smadja D, et al. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming and efficacy of a monoespecific antivenom. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52 (5): 419 - 26.

Thomas L, Tyburn B, and the Research Group on Snake Bite in Martinique. *Bothrops lanceolatus* bites in Martinique: clinical aspects and treatment. In: Bon C, Goyffon M. *Envenomings and their Treatments*. Fondation Marcel Mérieux: Lyon; 1996. p.255 - 65.

Thomas L, Tyburn B, Pecout F, Ketterle J, Biao T, Mehdaoui H, et al. Prognostic significance of clinical grading of patients envenomed by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 542 - 5.

Thomas L, Chausson N, Uzan J, Kaidomar S, Vignes R, Plumelle Y, et al.. Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-Lance" *Bothrops lanceolatus* in Martinique despite antivenom treatment: a report of three recent cases. *Toxicon* 2006; 48 (1): 23 - 8.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A* 1979; 76: 4350 - 4.

Urano S, Metzger AR, Castellino FJ. Plasmin-mediated fibrinolysis by variant recombinant tissue plasminogen activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 2568 - 71.

Varanda AE, Giannini MJSM. Bioquímica de Venenos de Serpentes. In: Barravieira B. Venenos Animais - Uma Visão Integrada. Rio de Janeiro: EPUC (Editora de Publicações Científicas Ltda); 1994. p.205 - 23.

Vale LH, Mendes MM, Hamaguchi A, Soares AM, Rodrigues VM, Homsibrandeburgo MI. Neutralization of pharmacological and toxic activities of bothrops snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 103(1):104 - 7.

Viljoen CC, Melhon CM, Boks DP. Separation of bits Gabonica (*Goboon adders*) venom arginine esterases into kinin-releasing, clotting and fibrinolytic factors. *Toxicon* 1979; 17: 145 - 54.

Vogel CW, Fritzing DC, Hew BE, Thorne M, Bammert H. Recombinant cobra venom factor. *Mol Immunol* 2004; 41 (2-3): 191 - 9.

Vogel CW, Fritzing DC. Humanized cobra venom factor: experimental therapeutics for targeted complement activation and complement depletion. *Curr Pharm Des* 2007; 13 (28): 2916 - 26.

Waldmann TA, White JD, Goldman CK, Top L, Grant A, Bamford R, et al.. The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia. *Blood* 1993; 82: 1701-12.

Weil CS. Tables for convenient calculation of median effective dose (LD_{50} or ED_{50}) and instructions in their use. *Biometrics* 1952; 9: 249.

Weller JM, Hobbs MV. Role of the third component of complement in immunoregulation. *Concepts in Immunopathology* 1987; 4: 103 - 28.

Wen FH. Soroterapia. In: Cardoso JLC, França FSO, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ. *Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Sarvier; 2003. p.380 - 93.

World Health Organization. Progress in the characterization of venoms and standardization of anti-venoms. Geneva: WHO; 1981. 44p. (WHO Offset Publication, 58).

Wuster W, Golay P, Warrell DA. Simposis of recent desenvolviments in venomous snakes systematics. *Toxicon* 1997; 35: 319 - 40.

8- ANEXOS



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

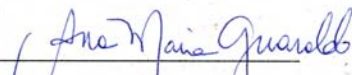
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1057-2, sobre "ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DO VENENO DE *BOTHROPS LANCEOLATUS* COM IMUNESOROS ESPECÍFICOS", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araújo / Marcelo de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 27 de setembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1057-2, entitled "STUDY OF VENOM NEUTRALIZATION THE *BOTHROPS LANCEOLATUS* WITH SPECIFICIC SERUM IMMUNE", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 27, 2006.

Campinas, 27 de setembro de 2006.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEIA-IB-UNICAMP

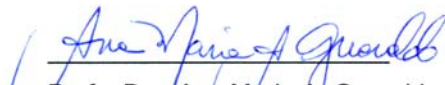
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1218-1, sobre "Estudo da neutralização do veneno de Bothrops lanceolatus com imunesoros específicos", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Albetiza Lôbo de Araujo / Marcelo de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEIA)-IB-UNICAMP em reunião de 28 de março de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1218-1, entitled "Study of venom neutralization of the Bothrops lanceolatus with specific immune serum ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 28, 2007.

Campinas, 28 de março de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

9- APÊNDICES

**38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e
Terapêutica Experimental**

SBFTE 40_{ANOS}

de 18 a 21 de Outubro de 2006

Centro de Convenções de Ribeirão Preto - SP

07.012 IMUNOFARMACOLOGIA

**“EFEITO DO VENENO DE *Bothrops lanceolatus* SOBRE
A RESPOSTA IMUNE HUMORAL”**

Carvalho, M.¹; Garcia, C. A. A. C.²; Araújo, P. M. F.³; Lôbo de Araújo, A.⁴ -
¹FCM - UNICAMP - Farmacologia; ²IB - UNICAMP - Microbiologia e Imunologia;
³UNICAMP - Microbiologia e Imunologia; ⁴UNICAMP - Farmacologia

Introdução: Venenos animais sempre instigaram a curiosidade dos pesquisadores devido ao grande número de acidentes. Buscando formas de evitar a letalidade de venenos como os de *Bothrops sp*(90,5% dos acidentes no Brasil; Fundação Nacional de Saúde1998) desenvolveu-se os imunesoros heterólogos que podem causar hipersensibilidade e trazer complicações à vítima acidentada. Foi observado em nosso laboratório que os imunesoros produzidos para o veneno de *Bothrops lanceolatus (B.l)* possuem títulos baixos de anticorpos neutralizantes quando comparados com outras espécies do gênero. Com o propósito de analisar

e potencializar o imunesoro para o veneno de *B.l* foi testado o efeito deste veneno frente à resposta imune humoral a antígenos não relacionados (Eritrócito de Carneiro [EC]).

Material e Métodos: Inoculação prévia do veneno de *B.l* na dose de 4,8µg/g;i.p 72hs antes dos estímulos primário(EP) e secundário(ES) com EC i.p 2% em camundongos Swiss machos(3 e 7 meses). Os títulos de anticorpos anti-EC foram determinados pelo teste de hemaglutinação em microplacas.

Resultado: No EP reduziu em 4,5 vezes de 1/118,4 (controle) para 1/26,4(n=5;P<0,05), e no ES reduziu em 2,6 vezes de 1/4096(controle) para 1/1568(n=4;P<0,05) quando comparados com o controle (apenas EC).

Discussão: Estes resultados demonstram que existe algum componente no veneno da *B.l* que reduz a produção de anticorpos reativos, o que poderia justificar uma baixa eficácia do imunesoro.

IX Congresso Brasileiro de Toxinologia

SBTx

De 28 de novembro a 02 de dezembro de 2006

Local: Ponta Mar Hotel

Fortaleza - Ceará

IMUNOTOXINOLOGIA

“INFLUENCE OF THE POISON OF *Bothrops lanceolatus* ON THE SYSTEM
IMMUNE FRONT TO ANTIGEN NON RELATE “

Autores: CARVALHO M.¹, GARCIA C. A. A. C.², ARAÚJO P. M. F.², LÔBO DE
ARAÚJO A.¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of
Campinas (UNICAMP, Campinas, Brasil);

²Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology (IB),
State University of Campinas (UNICAMP, Campinas, Brasil)

The main features associated with pit viper envenomations include the intense local lesions such as oedema, hemorrhagic complications, necrosis, acute renal failure and other effects. The severity of these reactions to snakebite depends on the degree of envenomation. These animal venoms have always inspired the researchers' curiosity due to the great number of accidents and their activities. Heterologous immune serums are produced to avoid the lethality of venoms such as the other *Bothrops* sp. (90,5 percent of the accidents in Brazil; National Foundation of Health 1998). However, they can cause hypersensitivity and bring complications to the victim. It was observed at our laboratory that the immune serums made for the venom of *Bothrops lanceolatus* (BL) possess low levels of neutralizing antibodies when compared with other species of the genus. With the purpose of analyzing and increasing the amount of immune serum for the venom of (BL), the effect was tested from this venom against the humoral immune response to non-related antigens (Sheep Erythrocytes [SE]). Previous inoculations of the venom of (BL) in the dose of 4,8µg/g; i.p, 72 hs before the primary (PI) and second (SI) inoculations with (SE) i.p 2% in Swiss male mice (3 and 7 months). The levels of anti-SE antibodies were certain for the hemagglutination test in micro platelets. In (PI) it was reduced to 4,5 times of 1/118,4 (control) for 1/26,4 (n=5; P<0,05), and in (SI) it was reduced to 2,6 times of 1/4096 (control) for 1/1568 (n=4; P<0,05) when compared with the control (just SE). These results demonstrated there is a component in the venom of (BL) that reduces the production of reagent antibodies, which could justify a low effectiveness of the immune serum.

13th International Congress of Immunology

Rio de Janeiro - Brazil - August 21st - 25th, 2007

Activity: Poster only

Current Date/Time: 8/29/2007 12:43:14 PM

“THE IMPROVEMENT OF THE ANTIVENIN OF *Bothrops lanceolatus* USING ONLY ONE FRACTION AS ANTIGEN “

Author Block: M. Carvalho¹, C. C. A. A. Garcia², P. M. F. Araújo², A. Lôbo de Araújo¹;

¹FCM - UNICAMP, Campinas, Brazil, ²IB - UNICAMP, Campinas, Brazil.

Abstract:

Animal venoms have always inspired researchers curiosity due to the great number of accidents and activities. Heterologous immune serums are produced to avoid venom lethality, including *Bothrops sp.* Venoms. However, they can cause hypersensitivity causing complications to the victim. Our laboratory observed that the immune serums made for the venom of *Bothrops lanceolatus* (BL) possess low levels of neutralizing antibodies when compared to the other species of the same genus. With the purpose of analyzing and increasing the amount of antibodies to neutralize immune serum for the venom of BL, its effect was tested against humoral immune response to non-related antigen (Sheep of Erythrocytes SE). Prior inoculations of the venom of BL in one sub lethal dose ($1/2$ DL₅₀, 4.8µg/g, i.p.)

72 hs observed significantly the levels of the antibodies anti-SE ($P<0,05$) in the primary and the secondary response in Swiss mice. The venom of BL was isolated in fractions (FI, FII, FIII) and eluted y gel-filtration chromatography on Sephadex G-100. Through the immunization in mice we identified suppressor fractions, which excluded for immunization in rabbit (dose: FII=1mg/animal, s.c., 5 sites) without and with adjuvant (Freud`s complete and incomplete). The FII (rich in phospholipase A₂ [PLA₂]) showed full immunogenic properties. When used in immunization, FII increased the antibody levels that neutralize BL venom, thus avoiding lethality. These results suggest that a PLA₂ is one of the antigenic main for production of the antivenin of BL.

ICI c/o Vienna Medical Academy

Alser Strasse4, A-1090 Vienna, Austria

Tel: (+43/1) 405 13 83-22

Fax: (+43/1) 407 82 74

Powered by OASIS, The Online Abstract Submission and Invitation System SM

© 1996 – 2007 Coe-Truman Technologies. Ine. All rights reserved.

J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.

V.13, n.4, p.964, 2007

III Graduation Workshop - Botucatu Medical School-UNESP

Abstract - ISSN 1678-9199.

**INFLUENCE OF *Bothrops lanceolatus* VENOM ON THE HUMORAL IMMUNE
RESPONSE TO NON RELATED ANTIGENS**

CARVALHO M.⁽¹⁾, DOTTO L. P.⁽¹⁾, GARCIA C. A. A. C.⁽²⁾, ARAÚJO P. M. F.⁽²⁾,
LÔBO DE ARAÚJO A.⁽¹⁾

⁽¹⁾Pharmacology Department, Medical Sciences Faculty (UNICAMP);

⁽²⁾Microbiology and Immunology Department, Biology Institute , State University of
Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

ABSTRACT: Damages related to poisoning by snake bites are common due to the complexity of such venoms. Its severity depends on the poisoning level, victim's immunological conditions, genetic factors, among others. The most effective treatment is serum therapy. In (South and Central) America, a large number of these accidents is caused by the *Bothrops genus*. Endemic in Martinique Island, in the Caribbean, the *Bothrops lanceolatus (BL)* possesses a different venom. As for the monovalent serum, we observed low levels of neutralizing antibodies when compared to the ones produced for the Brazilian, which may have been caused by some of the venom's components. In order to do research on the

influence of this venom on the humoral immune response, non related antigens (Sheep Erythrocytes [SE] at 2%, i.p) were used. Swiss mice (3 and 6 months old) were inoculated with a dose of $\frac{1}{2}$ DL₅₀ (4,8 μ g/g; i.p.) of *BL* venom, 72 hours before being immunized with SE, in the primary response (R1^a) or in the secondary response (R2^a). The control received only SE. The anti-SE antibodies were quantified through the hemagglutination test. In the R1^a it reduced 3.3 times, and in the R2^a, 9.3 times, both in relation to the control (n=5; P<0.05). Having accomplished the exclusion Chromatography in Sephadex G-100, 3 fractions (FI, FII and FIII) were obtained. In order to identify the fraction that presents this characteristic, the described protocol was repeated. The FI showed to be more effective on the inhibition (In the R1^a it reduced 4.5 times, and in the R2^a, 6.4 times, both in relation to the control: n=5; P<0.05). These results suggest that the BL's venom evidenced on the FI possesses components that inhibit the humoral immune response, which may be responsible for the low levels of neutralizing antibodies of the specific antivenin.

KEY WORDS: snake, *Bothrops lanceolatus*, venom, snake, antivenom

CONFLITS OF INTERESTS: There is no conflit

FINANCIAL SUPPORT: CENP

**40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e
Terapêutica Experimental
SBFTE**

**ATIVIDADES DO VENENO DA *Bothrops lanceolatus* E SUA NEUTRALIZAÇÃO
COM IMUNESOROS ESPECÍFICOS**

Carvalho M.¹, Dotto L. P.¹, Garcia C. A. A. C.², Barbosa-Souza, V.¹, Oliveira E. C.²,
Hyslop S.¹, Araújo P. M. F.², Lôbo de Araújo A.¹

¹Departamento de Farmacologia - Faculdade de Ciências Médicas

²Departamento de Imunologia e Microbiologia - Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil.

Introdução: Envenenamentos causados por picadas de serpentes peçonhentas, resultam em graves efeitos biológicos sobre os sistemas animais, devido a complexidade das peçonhas ofídicas, condições da vítima, fatores genéticos, entre outros. O tratamento mais eficaz de tais acidentes se faz com uso da soroterapia com proteínas heterólogas o que pode causar reações de hipersensibilidade. Endêmica da Ilha da Martinica no Caribe a *Bothrops lanceolatus* (BL) possui veneno similar aos botrópicos brasileiros.

Métodos: A peçonha desta serpente mostrou-se ativa sobre o sistema imune humoral de camundongos reduzindo o título de anticorpos contra antígenos não relacionados, mensurados através da técnica de hemaglutinação. Este efeito

também foi notado em algumas de suas frações semi purificadas através de cromatografia Sephadex G-100. Após estas informações, foi selecionada a fração (FII) do veneno da BL (não apresentou efeito inibitório sobre o sistema imune humoral), e utilizada como imunógeno, (misturada ao adjuvante Completo e Incompleto de Freund), para produzir um antiveneno mais efetivo (com menor quantidade de proteínas) para a neutralização das toxinas da peçonha, quando comparadas ao antiveneno produzido para o veneno total. Os antivenenos (Anti-BL produzido em cavalos e o Anti-FII produzido em coelhos) foram comparados quanto à concentração de anticorpos reativos ao veneno da BL, através do ELISA.

Resultados: O soro Anti-FII, apresentou maior título de anticorpos reativos que o Anti-BL, demonstrados através do teste de ELISA. A neutralização da atividade hemolítica indireta da peçonha foi maior pelo Anti-FII (n=6), assim como a atividade proteolítica sobre a caseína 1% (n=6), embora a neutralização da atividade hemorrágica tenha sido maior com o Anti-BL (n=6).

Discussão: Nossos resultados sugerem que existe a possibilidade de produzir imunossoros mais específicos e eficazes, para neutralizar as diversas atividades biológicas do veneno da BL, selecionando assim, frações que não contenham atividade inibidora sobre o sistema imune humoral e utilizando-as como imunógeno em animais soro produtores.

Agência Financiadora: CENP

The Improvement of the Antivenin of *Bothrops lanceolatus* Using Only One Fraction as Antigen

M. Carvalho¹, C.C.A.A. Garcia²,
P.M.F. Araújo² and A. Lobo de Araújo¹

¹FCM – UNICAMP, Campinas, Brazil, ²IB – UNICAMP, Campinas, Brazil

Summary

Serum therapy is necessary for poisoning caused by venomous animals and constitutes the most effective intervention. Snakes' venoms can contain substances that influence in the production of neutralizing³ antibodies. Studying *Bothrops lanceolatus*' venom (*BL*) inoculated in Swiss mice with a dose of $\frac{1}{2}DL_{50}$ (4.8 μ g/g, i.p) 72 hours before immunizing them with sheep erythrocytes (SE at 2%), we found a significant reduction of the antibodies' levels when compared with the control ($P < 0.05$). After separating *BL*'s venom into fractions (PI, PII, PIII), we identified and excluded the fraction which presented such activity and used the other fractions in immunization schemes using rabbits (1mg/1.25ml, s.c in 5 points on the back). Thus, we obtained *in vitro* serum with evidence of better reactivity. It suggests that the PII fraction contains one of venom's main immunogenic components.

Introduction

Poisonings happen very often, particularly in tropical countries where there is a wide range of venomous animals. Among them, the snakes stand out, such as the *Bothrops sp* kind of snake. Some of them stand out due to their adaptation to different environments such as islands, as for example, *Bothrops insularis* (Queimada Island), *Bothrops caribbaeus* (Saint Lucia Island) and *Bothrops lanceolatus* (Martinique Island), whose venom differs from other species² venoms. Poisoning by this kind of snake mainly causes the formation of thrombosis⁴.

Serum therapy is the most appropriate treatment for all actions of venoms.

It had its beginning from studies made by researchers such as Calmette (1895) and Vital Brasil (1901). Hypersensitivity reactions may occur due to the high number of heterologous proteins of hyperimmune serum. In order to try to minimize such reactions and produce better immune serums, methods, such as purification or pepsin digestion (Fab'2 or Fab fragments), are used. Studies of venoms' effect on the humoral immune system show the possibility of improving the production of hyperimmune³ serums. Clinical cases related by Thomas et al show that the antivenin for the *BL* may have lost part of its efficacy, which increases the quantity of serum used in the treatment of victims, suggesting however, the improvement of such antivenin⁴.

This thesis studied *Bothrops lanceolatus*' venom and its effects on mice's immune system. It identifies the venom's most immunogenic fractions which are able to stimulate the immune system to produce more reactive antibodies.

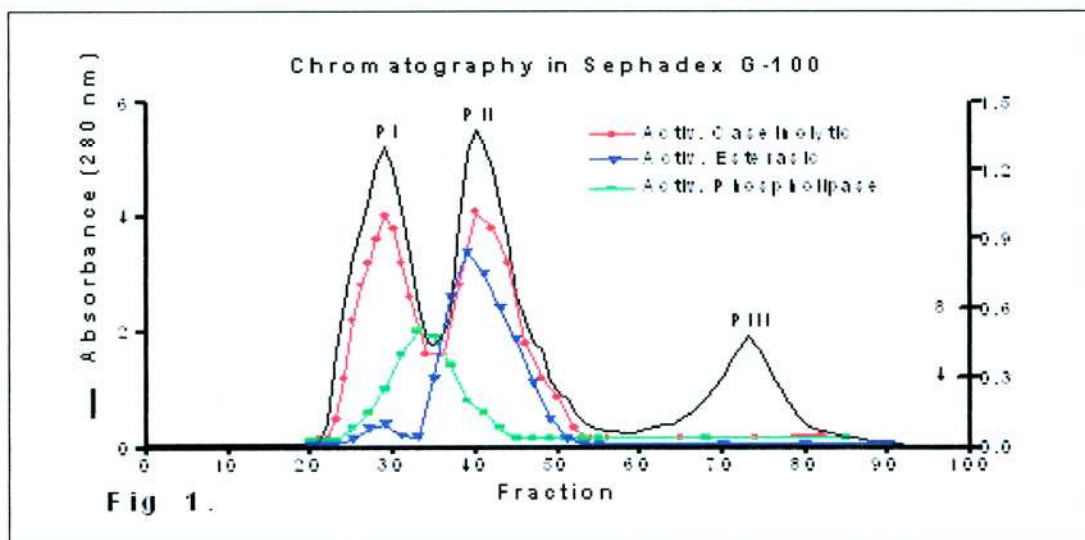
Material and Methods

Sérum: Anti - *Bothrops lanceolatus*, Institut Pasteur Paris, Lote: BO 278.

Venoms: *Bothrops lanceolatus* from Unité des Venins, Institut Pasteur, France. *Bothrops jararacussu* and *Bothrops jararaca* from the Department of Pharmacology (FCM- UNICAMP).

Immunization: Swiss mice, received venom from *BL* ($4,8\mu\text{g/g} = \frac{1}{2}\text{DL}_{50}$) or its fractions ($2,4\mu\text{g/g}$), in 0.2ml of PBS, pH 7.2, (i.p). After a period of 72 hours, they were immunized with sheep erythrocytes (SE) at 2% (i.p) suspended in 0.2ml of the same salt solution (first dose R1^a) (Fig 2). The same procedure was accomplished again 2 months later (second dose R2^a), when the control group received only SE. (Fig 3)

Hemagglutination: V-bottom plates were used, on which were put 25 μl of phosphate-buffer (PBS 0,1M, pH 7,2) in every well, followed by the same



volume of serums from the immunized mice with (SE) to accomplish the dilution. At the end, 25 μ l of SE at 2% were put in every well and, 2 hours later, the reading of the hemagglutinin title was accomplished.

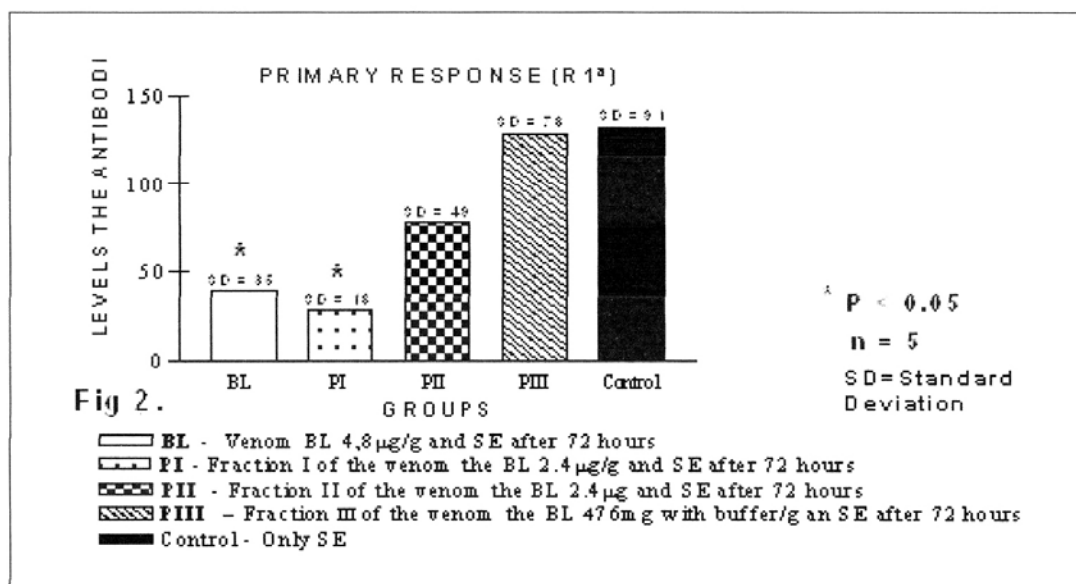
Immunization: White rabbits from New Zealand, 2.5 months old, were immunized with *BL*'s fraction II (1mg/1.25ml) in 5 points on the back, using Freund as an adjuvant diluent in the first 2 doses (1 $^{\circ}$ Complete, 2 $^{\circ}$ Incomplete) and in the other doses only PBS (2 weeks of intermission). The serum was picked up 7 days after the last dose.

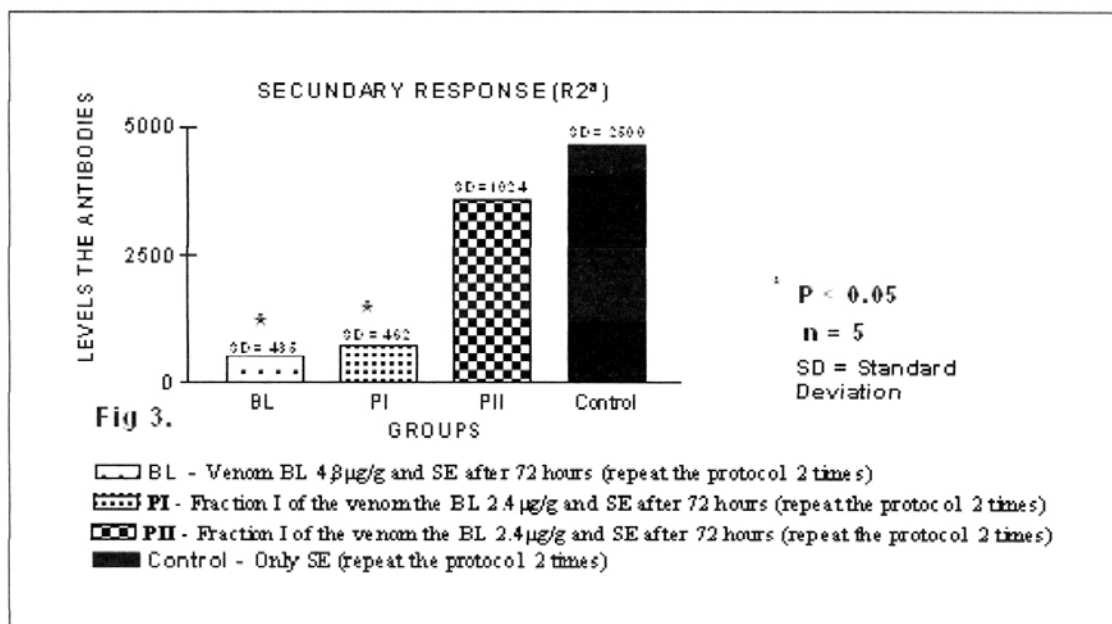
In vitro Test (Double Immunodiffusion): Agarose gel at 1% in salt solution (NaCl 0,15M) was put on glass blade, forming well in order to receive antigen or immune serum (10 μ l). After 24 hours in a humid chamber, the composition was washed in salt solution and subsequently tinted.

Exclusion Chromatography in Sephadex G-100 (Fig 1): The *Bothrops lanceolatus*' venom (200mg) was used to accomplish the chromatography. It was suspended in Tris-HCl, 50mM, pH 7,5 ("A"), for the concentration of 40mg/ml. After resting for 15 minutes, the solution was centrifuged at 13.000 x g during 5 minutes at 4 $^{\circ}$ C and was put in column (1,2 x 75cm) of Sephadex G-100 previously balanced with "A". The material was eluded at 4 $^{\circ}$ C, by using 5ml/h flow and collecting samples of 1,5ml per tube. The samples' protein concentration was estimated by the reading in an spectrophotometer at 280nm. The samples were subjected to enzymatic and biological tests, and then, grouped into three fractions (PI, PII and PIII), according to the activities contained. Each fraction, grouped in such way, was then dialyzed against distilled water at 4 $^{\circ}$ C during 24 hours and lyophilized.

Results

In this work, the *BL*'s venom influences the humoral immune system of





mice by significantly reducing anti-SE antibodies title, being the fraction I (PI) of *BL*'s venom the most effective in this inhibition (Fig 2 and 3). As the fraction II does not significantly inhibit the immune response of mice, it was used in immunization schemes in order to produce *in vitro* precipitation better than the commercial antivenin for *BL*'s venom.

Conclusion

In these conditions, the results suggest that if we withdraw the PI (influences the humoral immune system of mice by significantly reducing anti-SE antibodies title) from *BL*'s venom and use only PII to produce serum, which showed increases the *in vitro* the antibodies mostly reactive than the specific antivenom in the precipitation of *BL*'s venom. This indicates the presence of more effective antibodies.

References

- 1- JANEWAY Jr., CHARLES A. *Imnobiologia: O sistema Imunológico na Saúde e na Doença*. (Charles A. Janeway e Paul Travares; tradução Manuel May Pereira e Walkiria Settineri - 2º ed.) editora Porto Alegre: Artes Médicas. p. 11.10 - 11.11. (1997)
- 2- LÔBO DE ARAÚJO, A. ; DONATO, J. L. ; MORENO, R. A., PRADO-FRANCESCHI, J. Comparison of the phospholipase A2, Blood-clotting, caseinolytic esterolytic and hemorrhagic activities of some *Bothrops* snake venoms. In: *Third*

Pan American Symposium on animal, Plant and Microbial Toxins. Oaxtepec, 1990. *Toxicon* 28: 601. (1990)

- 3- STEPHANO M. A., GUIDOLIN R., HIGASHI H. G., TAMBOURGI D. V., SANT'ANNA O. A., The improvement of the therapeutic anti-Lachesis muta serum production in horses. *Toxicon* 45 (4): 467-73(2005).
- 4- THOMAS L., CHAUSSON N., UZAN J., KAIDOMAR S., VIGNES R., PLUMELLE Y., BUCHER B., SMADJA D., Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-Lance" *Bothrops lanceolatus* in Martinique despite antivenom treatment: A report of three recent cases. *Toxicon* 48: 23-28(2006).